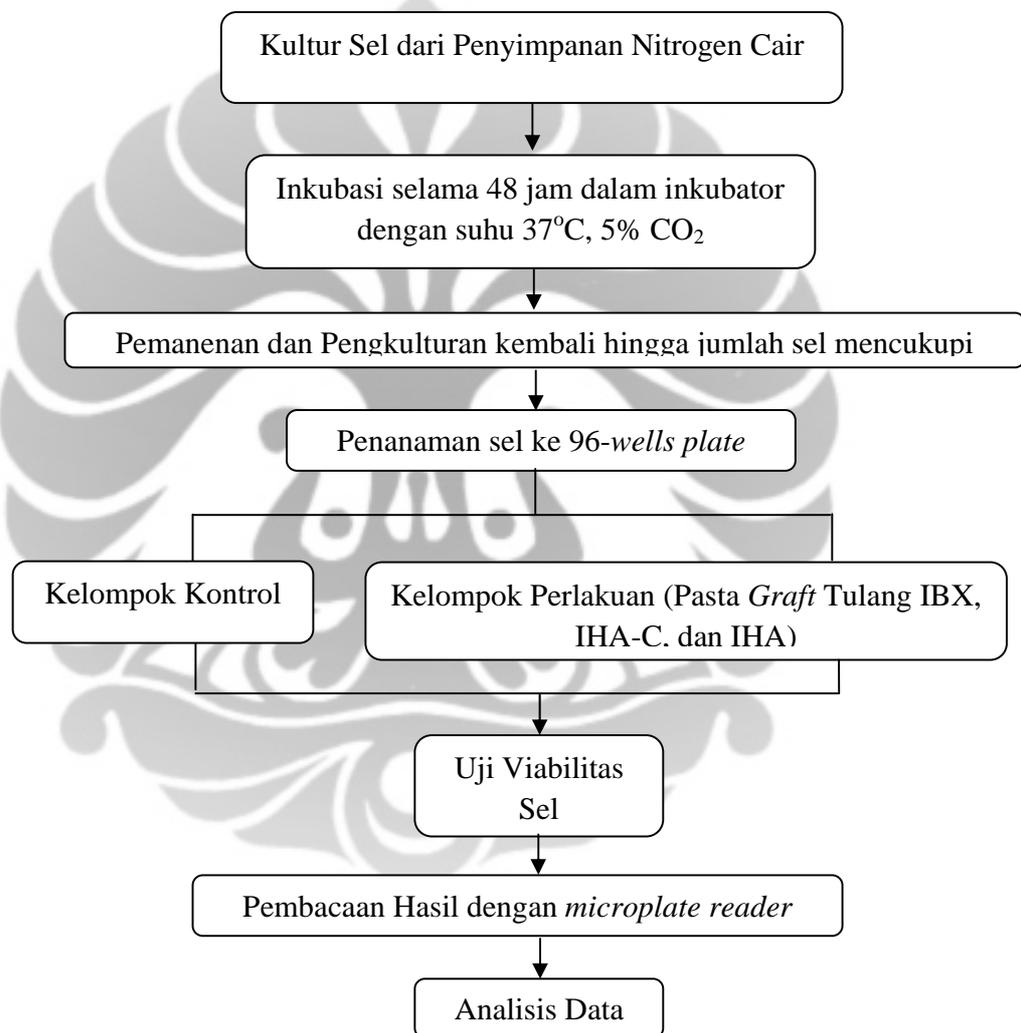


## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorik.

### 4.2 Alur Penelitian



### 4.3 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *osteoblas cell line* (MG 63) yang dikultur di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, sedangkan bahan uji yang digunakan adalah *graft* tulang *Injectable Bone Xenograft* (IBX), *Injectable Hydroxyapatite-Chitosan* (IHA-C), dan *Injectable Hydroxyapatite* (IHA) yang diproduksi oleh BATAN.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan Oktober 2008 sampai November 2008.

### 4.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Pasta *graft* tulang yang diproduksi oleh BATAN dengan konsentrasi 1%, 0,5%, dan 0,25%.

2. Variable Terikat

Viabilitas sel.

### 4.6 Definisi Operasional

1. Pasta IBX, IHA-C, dan IHA yang diproduksi oleh BATAN merupakan pasta yang terdiri dari *xenograft* yang berasal dari *bovine*, hidroksiapatit dan kitosan 1%. Dalam penelitian ini digunakan pasta *graft* tulang (BATAN) dengan tiga konsentrasi yaitu 1%, 0,5%, dan 0,25% .
2. Viabilitas *osteoblas cell line* adalah kemampuan sel *osteoblas* untuk bertahan hidup dan secara spesifik diartikan sebagai kemampuan untuk hidup, berkembang dan berproliferasi. Pada penelitian ini viabilitas sel diukur dengan MTT *assay*, yaitu uji *colorimetric* standard yang mengukur perubahan warna untuk mengukur pertumbuhan sel. MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), merupakan senyawa yang tereduksi menjadi ungu di dalam mitokondria sel hidup. Reduksi hanya terjadi bila terdapat enzim

reduktase yang diproduksi oleh mitokondrial aktif, sehingga perubahan tersebut secara langsung berkaitan dengan jumlah sel yang hidup.

#### **4.7 Alat, Bahan, dan Cara Kerja**

##### 4.7.1 Alat

1. Botol *Schott*
2. *Tube* 15 ml (Falcon, Biologix)
3. *Tube* 50 ml (Falcon, USA)
4. *Centrifuge* (SORVALL)
5. Cawan petri (NUNC, Denmark)
6. *24 well plate* (NUNNC, Denmark)
7. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
8. *Micropipet* (Eppendorf, German)
9. *Tips micropipette*
10. *Sterille syringe filter* (Corning, NY 14831, Jerman)
11. *Syringe* 50 ml (Terumo, Jepang)
12. Ependorf *Tube* (Axygen, USA)
13. Criofile (NUNC, Denmark)
14. *Hemocytometer*
15. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
16. Inkubator (Memert)
17. *Microplate reader* (Bio-Rad)
18. *Biohazard cabinet*

##### 4.7.2 Bahan

1. Medium kultur: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)
2. *Mili Q water*
3. *Penicillin Streptomycin*
4. Sodium Bikarbonat
5. Fungizone

6. *Fetal Bofine Serum (FBS)*
7. *L-Glutamine*
8. *Hepes Buffer Solution*
9. Pasta *Injectable Hydroxyapatite, Injectable Hydroxyapatite Chitosan, Injectable Bone Xenograft* hasil produksi dari BATAN
10. Bahan untuk *MTT assay* :
  - a. Larutan MTT 5 mg/ml
  - b. *Acidified Isopropanol*
11. *Fosfat Buffer Saline (PBS)*
12. Trypan Blue (Sigma, USA)

#### 4.7.3 Cara kerja

##### 4.7.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

Dalam penelitian *in vitro* ini seluruh alat, bahan dan prosedur kerja harus dijaga agar tetap steril. Untuk itu sebelum memulai melakukan penelitian, alat-alat dan beberapa bahan seperti *tips micropipet*, botol Schott, *MilliQ water*, dan PBS disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit. Selain itu, seluruh prosedur kerja dilakukan di dalam *biohazard cabinet*.

Sebelum kultur sel osteoblas dimulai, sediaan medium kultur yang akan digunakan dipersiapkan terlebih dahulu. Medium kultur ini dibuat dengan cara mencampurkan DMEM *phenol red* sebanyak 100 ml, lalu dilarutkan dengan *MilliQ water* sebanyak 113.250 µl, kemudian ditambahkan Sodium Bikarbonat 6.750 µl, *Penicillin Streptomycin* 100 µl, *Fungizone* 100 µl, L.Glutamine 4.500 µl dan Hepes Buffer 2.000 µl. Lalu medium kultur disimpan dalam lemari pendingin.

Sediaan medium kultur tersebut belum langsung dapat digunakan, karena harus ditambahkan FBS. Penambahan ini dilakukan dengan cara mengambil sediaan medium kultur tersebut sebanyak 45 ml dan dimasukkan ke dalam *tube* 50 ml, lalu FBS ditambahkan sebanyak 5 ml, lalu homogenkan. Kemudian campuran medium tersebut dipindahkan ke dalam *syringe* 50 ml, lalu lakukan penyaringan dengan

menggunakan *sterille syringe filter*. Dan hasil penyaringan tersebut dimasukkan ke dalam *tube* 50 ml.

#### 4.7.3.2 Kultur Sel Osteoblas

Kultur sel osteoblas ini dilakukan dengan mengambil sel osteoblas dari penyimpanan nitrogen cair. Sel osteoblas diambil sebanyak 100  $\mu$ l dengan menggunakan *micropipet*, lalu masukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan tambahkan PBS hingga 10 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm, suhu 24°C, selama 10 menit.

Selanjutnya supernatan dibuang dan PBS kembali dimasukkan 10 ml, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan, suhu dan waktu yang sama. Hal ini dilakukan agar sel menjadi bersih dari bahan pengawet (DMSO) yang diberikan selama sel disimpan dalam nitrogen cair. Setelah disentrifugasi, akan tampak *pellet* sel di dasar *tube*. Kemudian supernatan dibuang, lalu *pellet* yang terbentuk dilarutkan dengan medium kultur lengkap dan homogenkan dengan menggunakan *micropipet*.

Selanjutnya larutan tersebut dipindahkan kedalam cawan petri dan ditambahkan medium kultur lengkap hingga volume di cawan petri mencapai 7 ml. Masukkan cawan petri tersebut ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 48 jam. Setelah sel bertambah banyak, maka sel osteoblas tersebut siap untuk dipanen (*harvesting*).

#### 4.7.3.3 MTT Assay

Setelah melakukan beberapa kali pengkulturan sel dan sel telah bertambah banyak, lakukan pemanenan sel-sel osteoblas. Kultur sel osteoblas diambil dari dalam inkubator, lalu medium selnya dibuang dengan menggunakan pipet *pasteur*, lalu ditambahkan PBS untuk melakukan pencucian. Pencucian sebanyak tiga kali.

Kemudian sel dikumpulkan dengan *scraper*, lalu dipindahkan kedalam tabung sentrifugasi. Suspensi disentrifugasi (5 menit dalam 2000 rpm) hingga terbentuk *pellet* sel. Selanjutnya supernatan dibuang dan sel dicairkan dengan menggunakan medium kultur. Selanjutnya sel diambil dan dimasukkan medium sel

sebanyak 10  $\mu$ l ke dalam sebuah *ependorf tube*, lalu ditambahkan 80  $\mu$ l PBS dan 10  $\mu$ l *trypan blue*. Kemudian dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan *hemocytometer*.

Setelah dilakukan penghitungan sel, sel diresuspensi hingga mencapai  $10^6$  sel/ml dan volume sel tiap well sebanyak 50  $\mu$ l. Kemudian medium sel sebanyak 50  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tiap-tiap *well*, lalu diinkubasi selama 24 jam.

Lalu pada hari berikutnya, pasta *graft* tulang terlebih dahulu dipersiapkan sebelum prosedur *MTT assay* dimulai. Persiapan ini dilakukan dengan cara dilutasi pasta *graft* tulang yang terdapat dalam *syringe* dengan medium kultur sehingga diperoleh pasta *graft* tulang dengan konsentrasi 1%, 0,5% , dan 0,25%.

Setelah larutan pasta *graft* tulang selesai dipersiapkan, sel yang telah diinkubasi selama 24 jam dikeluarkan dari inkubator untuk diberikan perlakuan. Masing-masing larutan pasta dengan konsentrasi berbeda dimasukkan ke dalam 96-wells plate sebanyak 50  $\mu$ l. Kolom 1, 5, dan 9 tidak diberikan pasta *graft* tulang karena merupakan kolom untuk kelompok kontrol. Untuk pasta IBX dimasukkan ke kolom 2, 3, dan 4, pasta IHA-C dimasukkan ke dalam kolom 6, 7, dan 8, dan pasta IHA dimasukkan ke dalam kolom 10, 11, dan 12. Tiap-tiap well diisi dengan pasta *graft* tulang sebanyak 50  $\mu$ l. Lalu inkubasi selama 4 jam

Setelah inkubasi 4 jam, larutan *MTT* dimasukkan ke tiap-tiap *well* sebanyak 15  $\mu$ l. Kemudian diinkubasi kembali selama 3 jam. Setelah inkubasi selama 3 jam, tiap *well* diberikan *acidified isopropanol* sebanyak 150  $\mu$ l. Lalu *plate* ditempatkan pada *shaker* dengan kecepatan 50 rpm selama 1 jam.

Kemudian pembacaan dilakukan dengan menggunakan *microplate reader*, dengan panjang gelombang 490 nm. Selanjutnya persentase kelompok perlakuan dibandingkan dengan persentase kelompok kontrol dengan menggunakan rumus:

$$\text{Viabilitas Sel (\% dari Kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}}$$

Jika persentase viabilitas sel lebih kecil dari 100%, maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dikatakan bersifat toksik.

#### **4.8 Analisis Data**

Pada penelitian ini untuk menentukan jenis uji statistik yang digunakan perlu dilakukan uji normalitas data dengan uji Shapiro-Wilk, karena kelompok data berjumlah kecil ( $n < 40$ ). Hasil uji menunjukkan bahwa distribusi data normal, sehingga uji statistiknya menggunakan uji parametrik, yaitu *One Way ANOVA*.

