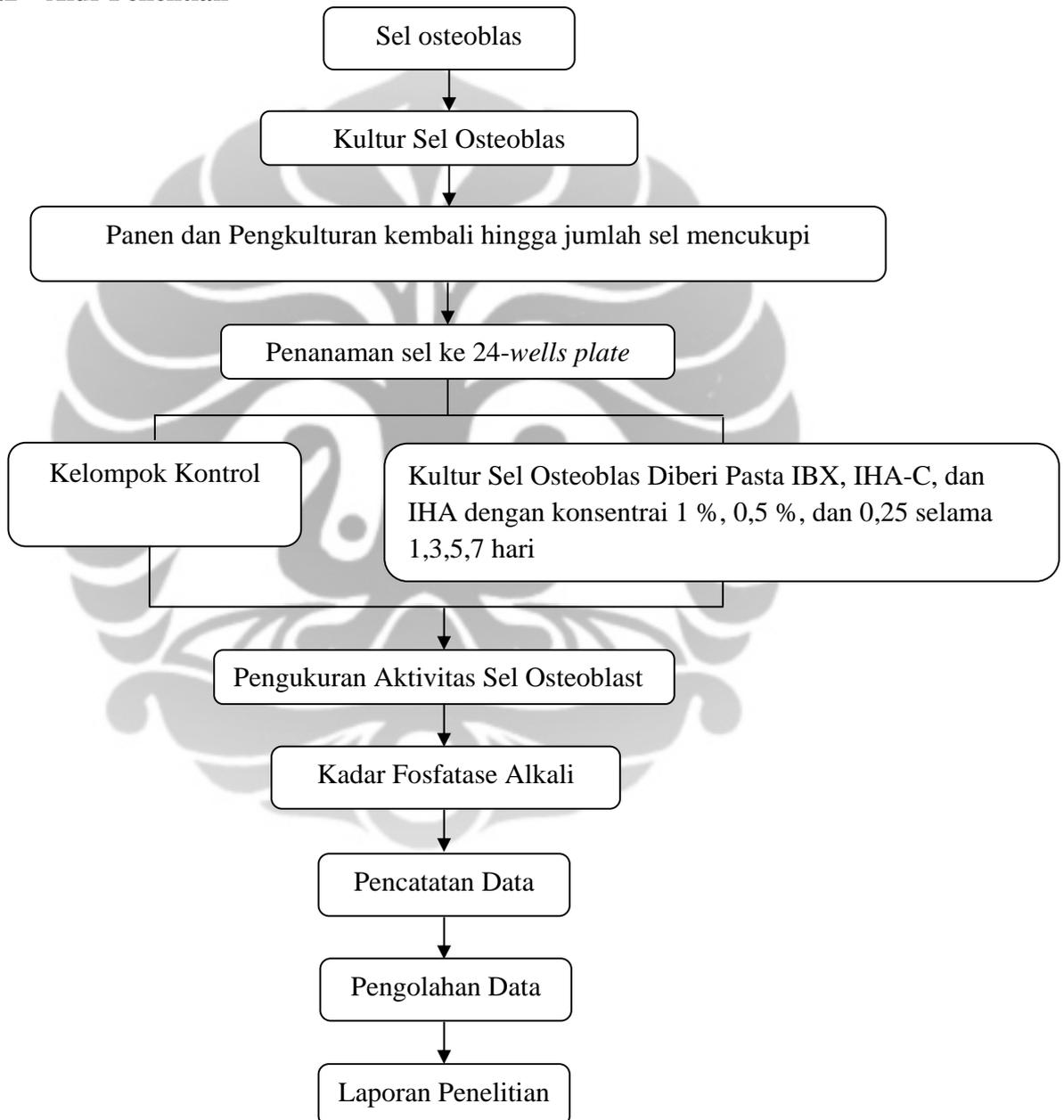


BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratotik.

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 Variable Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Pasta *graft* tulang yang diproduksi oleh BATAN dengan beberapa konsentrasi dan durasi yang berbeda.

4.5.2 Variable Terikat

Ekspresi fosfatase alkali.

4.6 Definisi Operasional

1. Pasta IHA, IHA-C dan IBX yang disintesis oleh BATAN merupakan pasta yang terdiri dari Hidroksiapatit, kitosan 1% dan xenograft yang berasal dari sapi muda (*bovine*). Dalam penelitian ini digunakan pasta *graft* tulang (BATAN) dengan beberapa konsentrasi dan durasi yang berbeda.
2. Fosfatase Alkali adalah enzim hidrolase yang bertanggung jawab dalam membuang gugus fosfat dari berbagai macam tipe molekul, termasuk nukleotida, protein dan alkaloid yang sebagian besar terdapat di hati dan tulang. Pengujian ekspresi fosfatase alkali pada sel osteoblas adalah untuk mengetahui peningkatan jumlah osteoblas karena induksi pasta *graft* tulang. Hal ini

berdasarkan pada teori yang mengatakan bahwa fosfatase alkali digunakan sebagai penanda dari pertumbuhan osteogenik.

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. *Sterille syringe filter* (Corning, NY 14831, Jerman)
10. *Syringe* 50 ml (Terumo, Jepang)
11. *Tube eppendorf* (Axygen, USA)
12. *Criofile* (NUNC, Denmark)
13. Hemositometer
14. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
15. Inkubator (Memert)
16. *Microplate reader* (Bio-Rad)
17. *Biohazard cabinet*
18. *Water bath* (CERTOMAT Biotech)

4.7.2 Bahan Kultur Sel

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 Bovine Serum* (FBS)
7. L-Glutamine
8. *Hepes Buffer Solution*
9. Pasta *Injectable Hydroxyapatite, Injectable Hydroxyapatite Chitosan, Injectable Bone Xenograft* hasil produksi dari BATAN
10. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
11. *Trypan Blue* (Sigma, USA)
12. Bahan ALP:
 - a. *Diethanolamine buffer*
 - b. *p- Nitrophenyl phosphate solution*

4.7.3 Cara kerja

4.7.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

Dalam penelitian diperlukan seluruh alat, bahan, dan prosedur kerja harus dalam kondisi tetap steril. Untuk itu alat-alat dan beberapa bahan, seperti tip pipet, botol Scotch, *MilliQ water*, dan PBS disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit.

Sebelum dilakukan pengkulturan sel, dibuat medium kultur dengan langkah-langkah sebagai berikut, yaitu sebanyak 100 ml DMEM *phenol red* dilarutkan dengan *MilliQ water* (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). Larutan ini kemudian disimpan dalam lemari pendingin (4°C). Medium kultur ini belum lengkap, sehingga perlu ditambahkan serum. Serum yang digunakan adalah *fetal bovine serum* (FBS). Langkah-langkah penambahan serum, yaitu dengan sebanyak medium kultur yang dibuat sebelumnya dimasukkan ke dalam tabung 50 ml. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan FBS sebanyak 5 ml, lalu dihomogenkan. Setelah larutan menjadi homogen, disaring dengan menggunakan filter 20 µm.

4.7.3.2 Kultur Sel Osteoblas

Sel osteoblas diambil dari tempat penyimpanan dalam nitrogen cair, lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi untuk dicuci, dengan cara menambahkan PBS sebanyak 8 atau 10 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 g pada suhu 24°C, selama 10 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan osteoblas akan tampak sebagai *pellet* dilarutkan kembali dalam medium kultur lengkap dan dihomogenkan dengan menggunakan *micropipet*. Osteoblas tersebut kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri dan ditambahkan medium kultur lengkap pada cawan petri mencapai 7 ml. Kemudian dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dengan CO₂ 5%.

4.7.3.3 Panen Sel Osteoblas

Setelah 48 jam, bila pertumbuhan mencapai keadaan *confluent*, maka dilakukan pemanenan.

4.7.3.4 Pengukuran Fosfatase Alkali pada Kultur Sel Osteoblas

Sebelum dimasukkan ke dalam 24 *well tissue culture*, sel osteoblas dihitung dalam hemositometer dan dimasukkan ke dalam *well* dengan kepadatan sel 10⁵ sel per *well*. Lalu sel osteoblas tersebut diberi perlakuan dengan pasta IBX, IHA-C, dan IHA

4.7.3.5 Persiapan Bahan Osteoinduksi

Aplikasikan pasta IBX, IHA-C, dan IHA dengan konsentrasi 1%, 0,5%, dan 0,25% pada masing-masing jenis pasta. Setelah aplikasi ketiga jenis pasta tsb dilakukan, supernatan pada *well* diambil dalam waktu 1, 3, 5, dan 7 hari untuk pengukuran kadar fosfatase alkali. Setelah seluruh supernatan telah diambil, maka dilakukan pengukuran fosfatase alkali dengan menggunakan teknik kolorimetri. Adapun langkah-langkahnya, yaitu: 96 *well* tersebut dimasukkan *reagent*

Diethanolamine buffer sebanyak 290 μl dan larutan larutan *p-Nitrophenyl phosphate* sebanyak 5 μl . Setelah semua reagen dimasukkan ke dalam 96 *well*, lalu dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian ditambahkan 5 μl simple. Selanjutnya catat peningkatan absorbansi pada 405 nm didalam *spectrophotometer* pada suhu 37°C dan kalkulasikan ΔA per min menggunakan bagian linear pada kurva (ΔA_s).

4.7.4 Pengolahan dan 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 tidak normal, sehingga uji statistiknya menggunakan uji non-parametrik, yaitu Kruskal Wallis dan Mann-Whitney.

