

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah eksperimental laboratorik.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur sel-sel pulpa yang berasal dari gigi manusia yang utuh, bebas karies, dan baru diekstraksi (kurang dari 6 jam). Gigi tersebut diperoleh dari RSGM-P Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan bagian Bedah Mulut RSCM dengan indikasi ekstraksi, misalnya untuk perawatan orthodonti. Sedangkan bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah xylitol konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16% produksi Lotte, Jepang.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Xylitol dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%.

4.4.2 Variabel Terikat

Protein total dan profil protein medium kultur sel-sel pulpa gigi (*in vitro*).

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Xylitol merupakan gula alkohol (*polyols*) yang mempunyai lima ikatan rantai karbon dengan rumus kimia $C_5H_{12}O_5$. Dalam penelitian

ini digunakan xylitol (Lotte, Jepang) dengan konsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%.

4.5.2 Sel-sel pulpa gigi adalah sel pulpa gigi manusia yang sehat dan baru di-ekstraksi kurang dari 6 jam. Sel-sel pulpa yang dipakai adalah sel-sel pulpa hasil subkultur dari kultur primer.

4.5.3 Protein total medium kultur adalah jumlah keseluruhan protein yang terkandung di dalam medium kultur dan diukur dengan Bradford *protein assay*, yaitu sebuah metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein berdasarkan aksi perubahan warna *Coomasie Brilliant Blue G-250 dye* (CBBG) pada saat berikatan dengan protein. Konsentrasi protein di dalam medium kultur dapat dibaca dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 655 nm.

4.5.4 Profil protein medium kultur adalah gambaran *band-band* berbagai protein dalam medium kultur sel-sel pulpa gigi yang merupakan hasil dari SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly-Acrylamide-Gel Elektrophoresis*) dengan *double staining* (*Coomassie Blue staining* dan *Silver staining*). Berat molekul protein dapat diidentifikasi dengan mengacu pada marker protein yang dipakai yaitu *See Blue Plus2*.

4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

4.6.1 Alat

1. *24 well plate* [NUNC, Denmark]
2. *96 microwell plate* [NUNC, Denmark]
3. Alat-alat SDS PAGE terdiri dari: bak elektroforesis, sisir, *glass plate, guidance*. [Bio-Rad]
4. *Alumunium foil*
5. *Autoclave*
6. *Biohazard cabinet*
7. Botol Schott
8. BR-2000 Vortexer [Bio-Rad]

9. *Cell scrapper* [NUNC, Denmark]
10. *Electrophoresis Power Supply – EPS 601* [Amersham Pharmacia Biotech]
11. Eppendorf *tube*
12. *Finnpipette* [Labsystems dan BIOHT-Proline]
13. GEL DOC 2000, Chemi Doc [Bio-Rad]
14. Gelas ukur
15. *Hemocytometer*
16. Inkubator [Memert]
17. Jarum ekstirpasi
18. Kertas hisap
19. Label sterilisasi
20. *Magnetic stirrer*
21. *Masker* dan *gloves*
22. *Micropipette* [Eppendorf, German]
23. *Microplate reader* [Bio-Rad]
24. Mikroskop [Nikon Elipse 80i]
25. *Mini Centrifuge* [Bio-Rad]
26. *Mortar* dan *pestle*
27. *Orbital Shaker* [CERTOMAT, Biotech international]
28. *Petri dish* [Corning]
29. pH Meter MP 220 [METTLER TOLEDO]
30. Pinset
31. Pipet Pasteur
32. *Sartorius Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 μm)
33. Sentrifugator [SORVALL]
34. Skalpel
35. *Syringe* 1 ml dan 50 ml [Terumo]
36. Tabung *Erlenmeyer*
37. *Thermo-block* NB-305TB [N-BIOTEK, INC]
38. *Thermolyne, stir plate* [Nuova]
39. Timbangan elektronik

40. Tip *micropipette*
41. *Tube* 15 ml [Corning 430791, USA]
42. *Tube* 50 ml [Corning 430829, USA]
43. *Water bath* [CERTOMAT, Biotech International]
44. *White Light* 2000 [Bio-Rad]

4.6.2 Bahan

1. *Acetic Acid*
2. *Acrylamide*
3. AgNO_3 20% [MERCK, Darmstadt, German]
4. *Ammonium Persulfate ACS Grade*
5. *Aquadest*
6. *Citric Acid*
7. *Coomassie Blue*
8. *Ethanol* 70%
9. *Fetal Bovine Serum* (FBS)
10. *Formaldehyde* 37%
11. *Fungizone* (Amphotericin B 250 UG/ml) [Gibco, UK]
12. Gigi utuh bebas karies yang baru diekstraksi
13. *Glycine* [Applichem, Darmstadt, German]
14. Larutan *Bradford* [Sigma]
15. Larutan NaCl 0,9%
16. Medium Kultur: Bubuk *Dulbecco's Modification of Eagle's Medium* (DMEM) *high glucose* dan mengandung: *L-Glutamine*, 110 mg/l *Sodium Pyruvate*, dan *Pyridoxine Hydrochloride* [Gibco, UK]
17. *Methanol*
18. *MiliQ water*
19. Na_4OH (*Concentrate*)
20. NaHCO_3 7,5%
21. *Native Buffer Sample* [Bio-Rad]
22. *Natriumhydroxide* 0,2 M [MERCK, Darmstadt, German]

23. *Penicillin-Streptomycin* [Gibco, UK] yang mengandung 10.000 Units/ml *Penicillin G Sodium* dan 10.000 µg/ml *Streptomycin Sulfate* dalam *saline* 0,85%
24. *Periodic Acid*
25. *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
26. *Protein standard - Bovine Serum Albumin* (BSA) 75.000 µg/ml [Gibco, UK]
27. *See Blue plus2 pre-stain standard* [Invitrogen, Carlsbad, CA]
28. *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10%.
29. TEMED *Elektroforesis grade*
30. Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane [Qbiogene]
31. Tris HCL
32. *Trypan blue* [Sigma]
33. Xylitol [Lotte, Japan]

4.6.3 Cara Kerja

4.6.3.1 Persiapan Alat dan Bahan

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Mortar dan *pestle*, tip *micropipette*, botol *Schoot*, jarum ekstripasi, pinset, gagang skalpel, larutan NaCl 0,9%, larutan PBS, *MiliQ water*, dan *Eppendorf tube* disterilisasi dengan *autoclave* (120°C) selama 20 menit.

B. Pembuatan Medium Kultur Lengkap (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)

Bubuk DMEM dilarutkan dalam *MiliQ water*, kemudian ditambahkan *Penicillin-Streptomycin*, dan NaHCO₃ sampai didapat pH 7,4. Kemudian, medium kultur ditambah dengan FBS (10%) dan disaring dengan menggunakan *syringe* 50 ml dan '*Sartorius*' *Minisart single use syringe filter sterile-EO* (0,20 µm).

C. Pembuatan *Protein Standard BSA*

Protein standard BSA disiapkan pada *tube-tube* pada konsentrasi 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1600 µg/ml, dan 3200 µg/ml dengan pelarut PBS dan disimpan dalam kotak es.

4.6.3.2 Koleksi Sel-sel Pulpa Gigi

Sel-sel pulpa gigi didapatkan dari gigi utuh tanpa karies yang baru diekstraksi kurang dari 6 jam. Gigi tersebut disimpan dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% yang diletakkan didalam kotak yang berisi es untuk menjaga vitalitas sel pulpa. Gigi tersebut dibersihkan dengan scalpel kemudian dipecahkan dengan *mortar-pestle* untuk mendapatkan jaringan pulpa yang terdapat pada ruang pulpa. Jaringan pulpa tersebut diambil dengan jarum ekstirpasi dan ditempatkan pada *petri dish* yang sudah berisi medium kultur.

4.6.3.3 Kultur Sel-sel Pulpa Gigi (dilakukan di dalam *biohazard cabinet*)

Jaringan pulpa gigi yang telah dikoleksi kemudian dihancurkan sehalus mungkin. Kemudian seluruh jaringan pulpa gigi beserta mediumnya dipindahkan ke dalam *tube* 15 ml lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2000 G. *Supernatant* dibuang dan *pellet* dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap dan diikuti dengan *pipetting* kembali agar diperoleh sel-sel pulpa yang terdisintegrasi dengan baik. Selanjutnya sel-sel pulpa tersebut dikultur (37° C dan 5% CO₂) pada sejumlah *petri dish* sampai terlihat sel tumbuh padat merata (*confluent*), yaitu sekitar 1 sampai 2 hari. Medium kultur diganti dengan yang baru setiap harinya. Bila telah *confluent*, sel pulpa dipanen dengan

menggunakan *cell scrapper*, dan dikoleksi ke dalam *tube* 15 ml. Kemudian *tube* disentrifugasi dengan kecepatan 2000 G selama 10 menit. *Pellet* yang terbentuk dilarutkan kembali dengan medium kultur lengkap. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer* di bawah mikroskop (pembesaran 4 x /0.10). Selanjutnya sel pulpa diinkubasi (37° C dan 5% CO₂) kembali selama semalam dalam 24-*well plate* dengan jumlah 2 x 10⁵ sel pada setiap *well*.

4.6.3.4 Pemaparan Xylitol dengan Konsentrasi 2%, 4%, 8%, 16% pada Kultur Sel-sel Pulpa Gigi

Medium kultur diganti, dan kultur sel pulpa kelompok perlakuan dipaparkan dengan xylitol berkonsentrasi 2%, 4%, 8%, dan 16%. Selanjutnya, sel-sel pulpa kelompok kontrol dan kelompok perlakuan diinkubasi (37°C dan 5% CO₂) selama semalam.

4.6.3.5 Pengukuran Konsentrasi Protein Total Medium Kultur dengan Bradford Protein Assay

Sejumlah 500 µl sampel medium kultur pada setiap *well* diaspirasi dan dipindahkan ke eppendorf *tube* yang telah disiapkan. Sejumlah 160 µl sampel medium kultur sel pulpa ditempatkan pada 96-*well plate* (triplo). Hal yang sama dilakukan pada *protein standard* BSA yang telah disiapkan. Selanjutnya pada *well* yang berisi sampel dan *protein standard* BSA ditambahkan dengan 40 µl larutan Bradford, dan dibiarkan selama 20 menit. Konsentrasi protein total medium kultur dibaca dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 655 nm.

4.6.3.6 Penentuan Profil Protein Medium Kultur dengan SDS PAGE

A. Persiapan Alat dan Bahan

Perlengkapan SDS PAGE seperti bak elektroforesis, plat kaca, sisir, dan *guidance* disiapkan dan dibersihkan. Kemudian larutan *resolving gel* dibuat dengan pH 6,8 dan *stacking gel* dibuat dengan pH 8,8.

B. Pembuatan Gel Elektroforesis

Larutan *resolving gel* diinjeksi terlebih dahulu ke dalam celah diantara plat kaca sampai sekitar 1 cm dari bagian atas kaca. Selanjutnya, *aquadest* dimasukkan untuk menghindari pengerutan dan hasil *gel* yang bergelombang. Kemudian *resolving gel* didiamkan sekitar 20 menit hingga *gel* mengeras. *Aquadest* dihisap dengan kertas hisap, dan diikuti dengan memasukkan larutan *stacking gel*. Selanjutnya sisir pembentuk *well* dimasukkan di atas *stacking gel*. Selanjutnya *stacking gel* dibiarkan selama sekitar 1 jam hingga *gel* mengeras. Setelah *gel* mengeras, sisir pembentuk *well* diangkat secara hati-hati. Plat kaca tersebut kemudian dimasukkan ke dalam bak elektroforesis. Kemudian isi bak elektroforesis dengan *SDS reservoir buffer* sampai *gel* terendam seluruhnya.

C. Persiapan Sampel

Sample yang digunakan sama dengan yang dipakai pada Bradford *protein assay*. Sejumlah 240 µg protein dari masing-masing kelompok sampel dimasukkan ke dalam masing-masing Eppendorf *tube* diikuti dengan penambahan *native sample buffer* (Volume = 1 : 1). Sejumlah 10 µl *See Blue Plus2 pre-stain standard*

dimasukkan pada salah satu *well* dan diikuti dengan injeksi sampel medium kultur pada *well* yang lain.

D. Proses Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan 2 tahap, yaitu P1 dan P2. Tahap P1 dilakukan selama 30 menit, dengan kondisi kuat arus 80 mA, tegangan 100 V, dan daya 30 W. Setelah P1 selesai dilaksanakan, P2 dijalankan dengan kondisi kuat arus 100 mA, tegangan 100 V, dan daya 80 W selama sekitar 2 jam atau sampai *See Blue Plus2 pre-stain standard* terseparasi dengan baik.

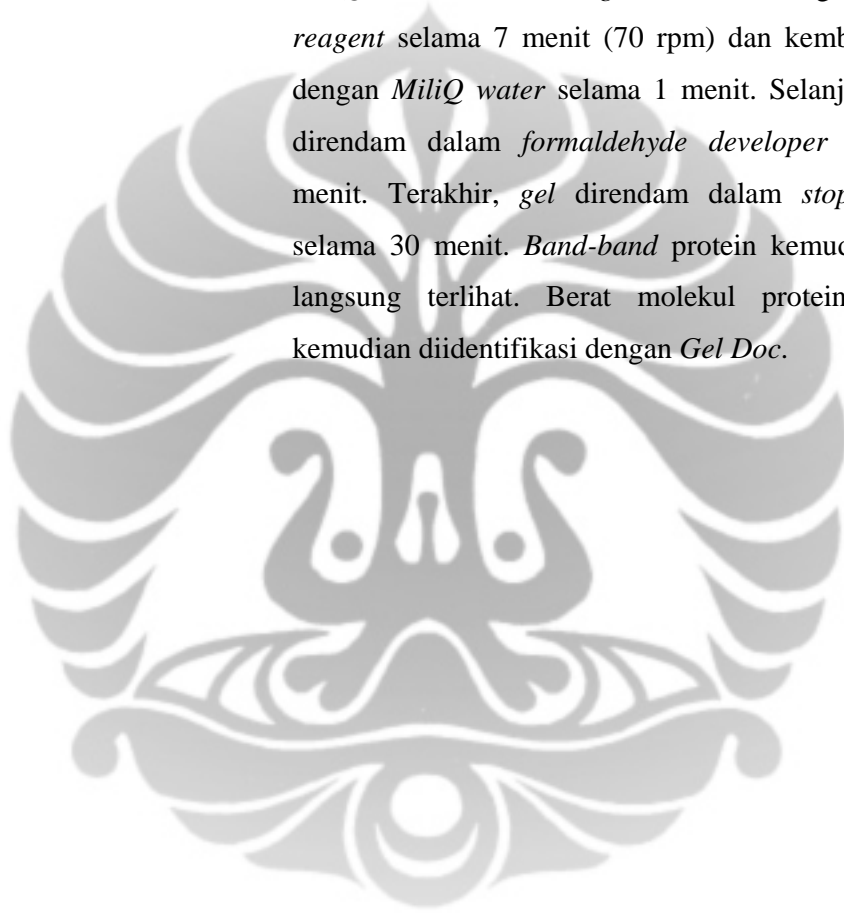
E. Proses Pewarnaan

Pewarnaan dilakukan sebanyak 2 kali (*double staining*) yaitu dengan *Coomassie Blue* dan *Silver staining*. Pewarnaan dengan *Coomassie Blue* dilakukan selama 1 malam di atas *orbital shaker* 40 rpm. Kemudian, *gel* dicuci dengan *destaining solution* sebanyak 2 kali, masing-masing 30 menit di atas *orbital shaker* 40 rpm. Sebelum melakukan pewarnaan dengan *Silver staining*, perlu disiapkan 5 macam larutan yang dibutuhkan, yaitu:

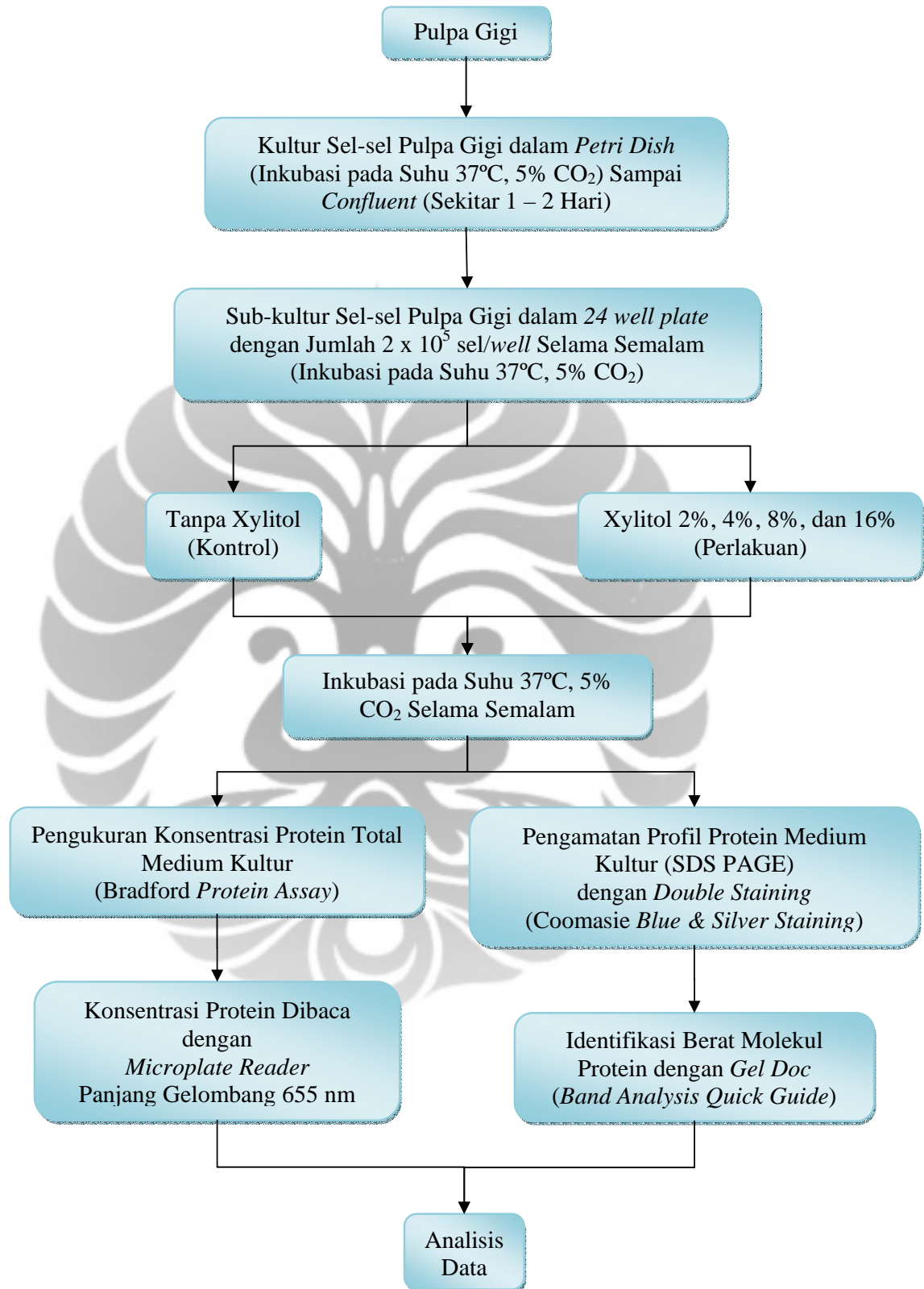
- *fixing solution*, yang terbuat dari 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *oxidising solution*, yang terbuat dari 0,7% *periodic acid* dalam 40% ethanol dan 5% asam asetat
- *staining reagent*, yang terbuat dari 18% NaOH 0,2 M, 1.3% NH₄OH, dan 3.3% AgNO₃ 20%
- *formaldehyde developer*, yang terbuat dari *formaldehyde* 37% dan asam sitrat

- *stop solution*, yang terbuat dari Tris base dan 80% asam asetat

Tahap awal *Silver staining* adalah merendam *gel* dengan *fixing solution* selama 60 menit. Kemudian *gel* direndam dengan *oxidising solution* selama 10 menit yang diikuti pencucian sebanyak 2 x 10 menit dengan *MiliQ water*. Kemudian *gel* direndam dengan *staining reagent* selama 7 menit (70 rpm) dan kembali dicuci dengan *MiliQ water* selama 1 menit. Selanjutnya, *gel* direndam dalam *formaldehyde developer* selama 3 menit. Terakhir, *gel* direndam dalam *stop solution* selama 30 menit. *Band-band* protein kemudian dapat langsung terlihat. Berat molekul protein tersebut kemudian diidentifikasi dengan *Gel Doc*.



4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Perbedaan rerata konsentrasi protein total medium kultur sel-sel pulpa gigi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, dan antara kelompok perlakuan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji *Oneway* ANOVA. Profil protein medium kultur sel-sel pulpa gigi dianalisis secara kualitatif.

4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh surat lolos uji etik penelitian dari Komisi Etik Penelitian FKG UI tertanggal 11 April 2008 dengan Nomor Surat: 69/Etichal Clearance/II/FKGUI/2008.

