



**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KALSIMUM
CANGKANG TELUR TERHADAP
KULTUR SEL OSTEOLAS**

SKRIPSI

Oleh
I Putu Swastikawan Ari Kusumadewa
NIM 151610101058

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KALSIUM
CANGKANG TELUR TERHADAP
KULTUR SEL OSTEOLAS**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

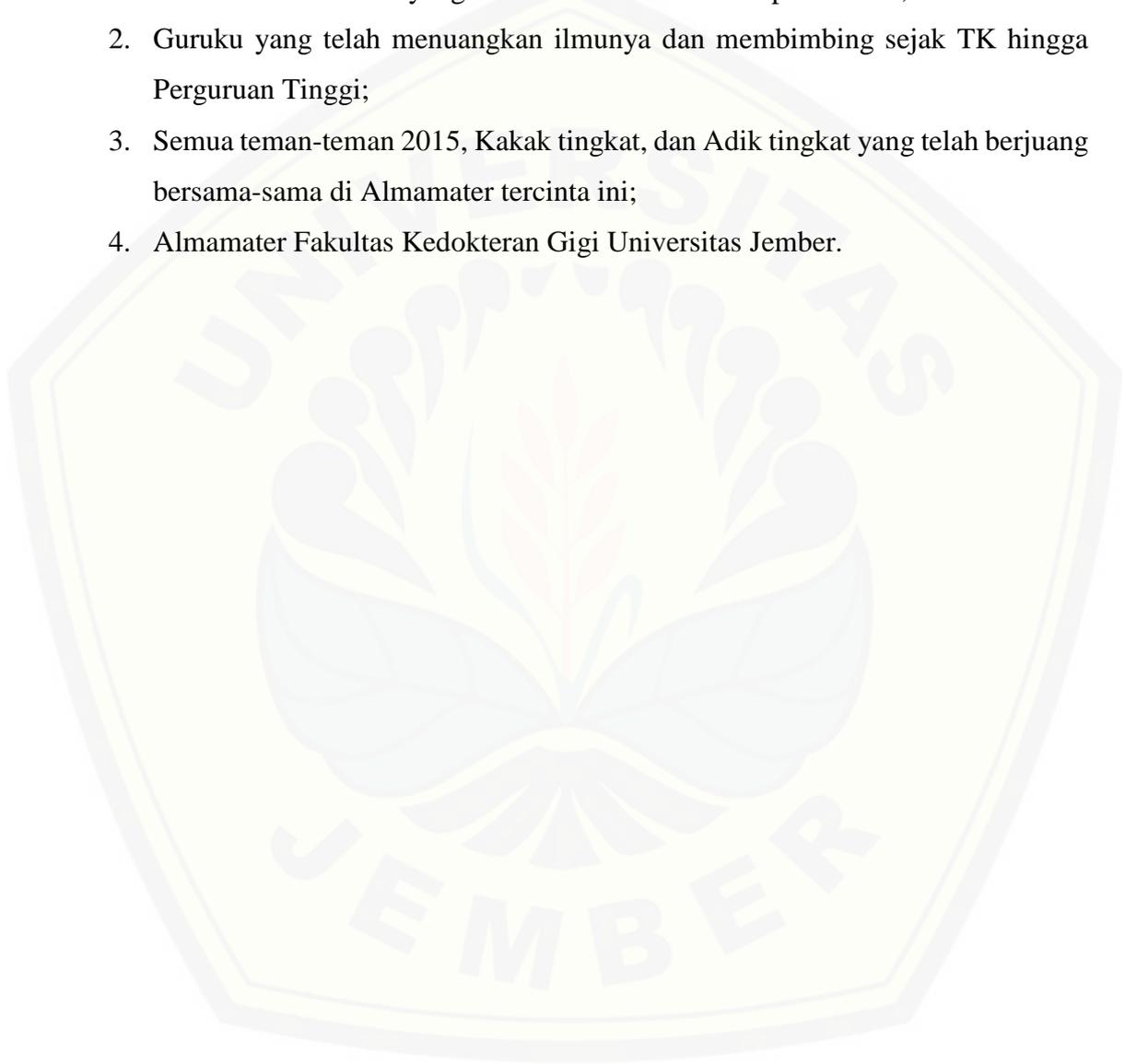
**I Putu Swastikawan Ari Kusumadewa
NIM 151610101058**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Dengan setulus hati skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Papa I Wayan Mudana, Mama Endang Setyorini, Adik Made Ayu Wedanty Swastika Ningrum atas segala kasih sayang, motivasi, nasehat dan bimbingan, serta doa setulus hati yang tiada henti diberikan sampai saat ini;
2. Guruku yang telah menuangkan ilmunya dan membimbing sejak TK hingga Perguruan Tinggi;
3. Semua teman-teman 2015, Kakak tingkat, dan Adik tingkat yang telah berjuang bersama-sama di Almamater tercinta ini;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTTO

“Hidup adalah pilihan”



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : I Putu Swastikawan Ari Kusumadewa

NIM : 151610101058

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Uji Sitotoksitas Ekstrak Kalsium Cangkang Telur terhadap Kultur Sel Osteoblas” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2018

Yang menyatakan,

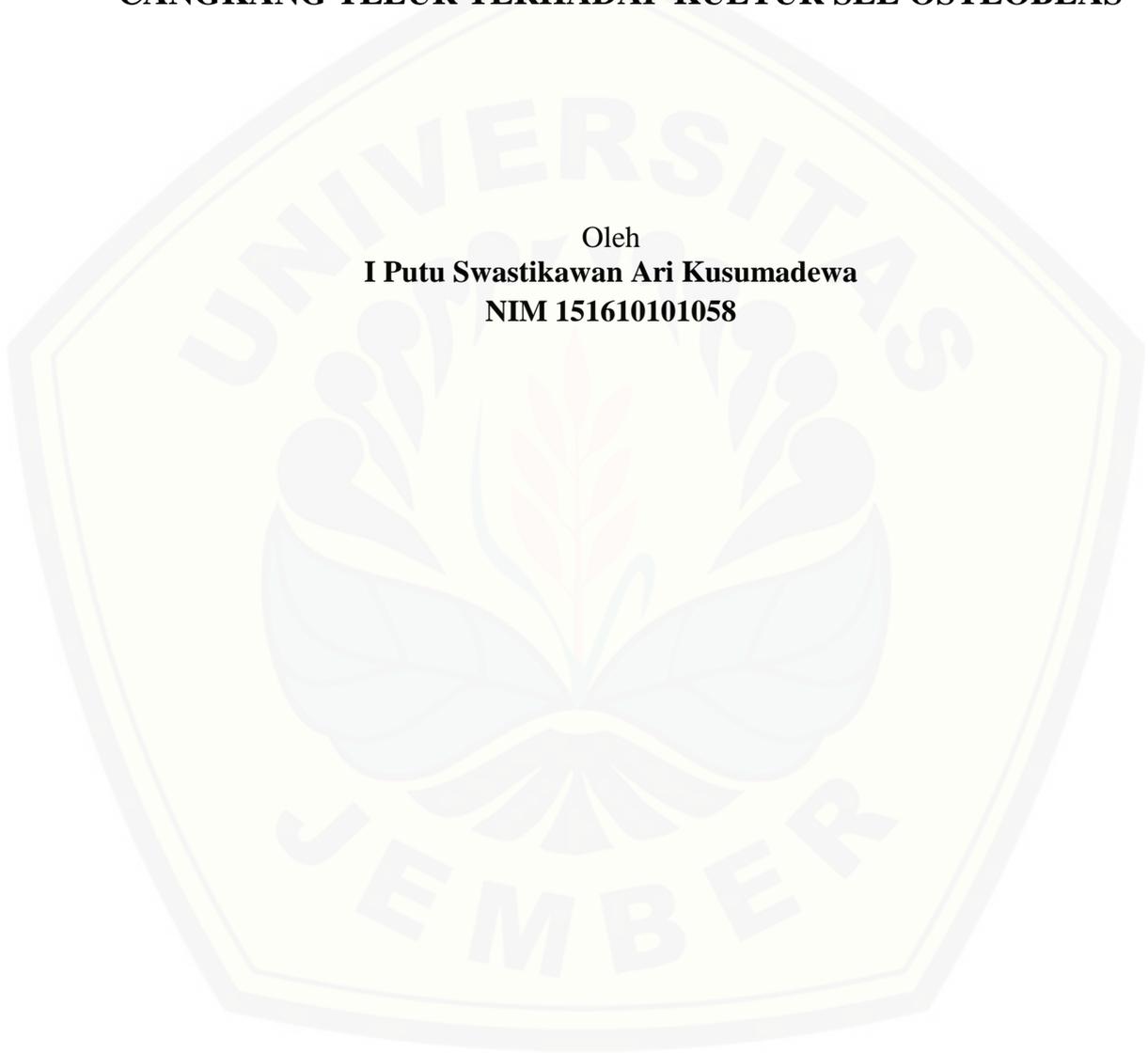
I Putu Swastikawan A. K.

NIM 151610101058

SKRIPSI

**UJI SITOTOKSISITAS EKSTRAK KALSIMUM
CANGKANG TELUR TERHADAP KULTUR SEL OSTEOBLAS**

Oleh
I Putu Swastikawan Ari Kusumadewa
NIM 151610101058



Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

: drg. Agus Sumono, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping

: drg. Dwi Merry Ch. R., M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Kalsium Cangkang Telur terhadap Kultur Sel Osteoblas” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Jum’at, 31 Mei 2019

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes
NIP. 197005091999032001

drg. Rendra Chriestedy Prasetya, MD.Sc
NIP. 198305312008011003

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Agus Sumono, M.Kes
NIP. 196804012000121001

drg. Dwi Merry Christmarini R., M.Kes
NIP. 197712232008122003

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost
NIP. 196901121999601001

RINGKASAN

Uji Sitotoksisitas Ekstrak Kalsium Cangkang Telur Terhadap Kultur Sel Osteoblas; I Putu Swastikawan Ari Kusumadewa, 151610101058, 41 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Kerusakan tulang di rongga mulut merupakan hal yang sering terjadi, salah satunya adalah keadaan pasca pencabutan gigi. Tindakan pencabutan gigi melibatkan jaringan tulang dan jaringan lunak rongga mulut. Kerusakan jaringan keras atau tulang yang terjadi pasca pencabutan dapat berupa fraktur tulang alveolar. Adanya kerusakan tulang alveolar tersebut memerlukan proses penyembuhan. Kalsium merupakan salah satu bahan yang digunakan dalam terapi *bone graft* yang kemudian disintesis menjadi hidroksiapatit. Salah satu metode untuk mensintesis hidroksiapatit adalah metode *wet chemical* yang menggunakan prekursor kalsium dan prekursor fosfat. Cangkang telur ayam memiliki konsentrasi kalsium yang besar sehingga dapat digunakan sebagai bahan prekursor kalsium dalam terapi regeneratif tulang.

Jenis penelitian ini adalah observasional analitik. Sampel yang digunakan berupa ekstrak kalsium cangkang telur dengan konsentrasi 150 µg/ml, konsentrasi 75 µg/ml, konsentrasi 37,5 µg/ml, konsentrasi 18,75 µg/ml, konsentrasi 9,375 µg/ml, konsentrasi 4,68 µg/ml, dan konsentrasi 2,34 µg/ml. Prosedur penelitian diawali dengan melakukan kultur sel primer osteoblas, setelah sel osteoblas 80% konfluen dilakukan prosedur panen dan perhitungan sel. Prosedur selanjutnya adalah melakukan uji sitotoksisitas MTT *assay* terhadap kultur sel primer osteoblas .

Hasil penelitian menunjukkan persentase viabilitas tertinggi terdapat pada sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 2,34 µg/ml. Viabilitas terendah ditunjukkan oleh sel osteoblas yang dipapar oleh ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 150 µg/ml. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka, viabilitas sel makin rendah. Konsentrasi optimum ditentukan berdasarkan konsentrasi yang mampu mempertahankan viabilitas sel dengan baik. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 37,5 µg/ml, 18,75 µg/ml, 9,375 µg/ml, 4,68 µg/ml, 2,34 µg/ml mampu mempertahankan viabilitas sel osteoblas dengan baik yaitu diatas 90%. Konsentrasi 2,34 µg/ml dipilih sebagai konsentrasi ekstrak kalsium cangkang telur ayam optimum digunakan pada sel osteoblas .

Hasil perhitungan IC_{50} menunjukkan adanya aktivitas penghambatan 50% (IC_{50}) dari ekstrak kalsium cangkang telur ayam berada pada konsentrasi 298 µg/ml. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kalsium cangkang telur ayam dapat mempertahankan viabilitas sel osteoblas dan peningkatan konsentrasi paparan menyebabkan penurunan viabilitas sel.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Sitotoksisitas Ekstrak Kalsium Cangkang Telur Terhadap Kultur Sel Osteoblas”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. drg. Agus Sumono, M.Kes., dan drg. Dwi Merry Christmarini Robin, M.Kes., selaku dosen pendamping penelitian dan dosen pembimbing skripsi.
3. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes., dan drg. Rendra Christedy Prasetya, MD.Sc , M.Kes., selaku dosen penguji skripsi.
4. I Wayan Mudana, Endang Setyorini, Made Ayu Wedanty Swastika Ningrum penyemangatu, yang selalu ada dan membantu dalam penyelesaian skripsi ini.
5. Seluruh staf di fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang mendukung dalam penulisan ini.
6. drg. Ahmad Gunadi MS., Ph.D sebagai dosen pembimbing akademik.
7. Sahabat – sahabat kos dewa, yaitu mas Nurqum, mas Wangwang, Idris, Rafif, Gafran, Rafi.
8. Sahabat – sahabat mastrip, yaitu Ruri, Ridho, Fahmi, Ulum, Falah.
9. Sahabat DPA, yaitu Sherlika.
10. Sahabat – sahabat yang membantu penelitian, yaitu Fergy, Abdullah, Luthfi, Luaily, Ifa.
11. Ibu Ituz dan Mbak Titin selaku staf Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
12. Seluruh teman-teman seperjuangan FKG angkatan 2015. Terima kasih atas dukungan dan doa kalian selama ini.

13. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas perhatian dan bantuan yang telah diberikan hingga tersusunya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 31 Mei 2019

Penulis



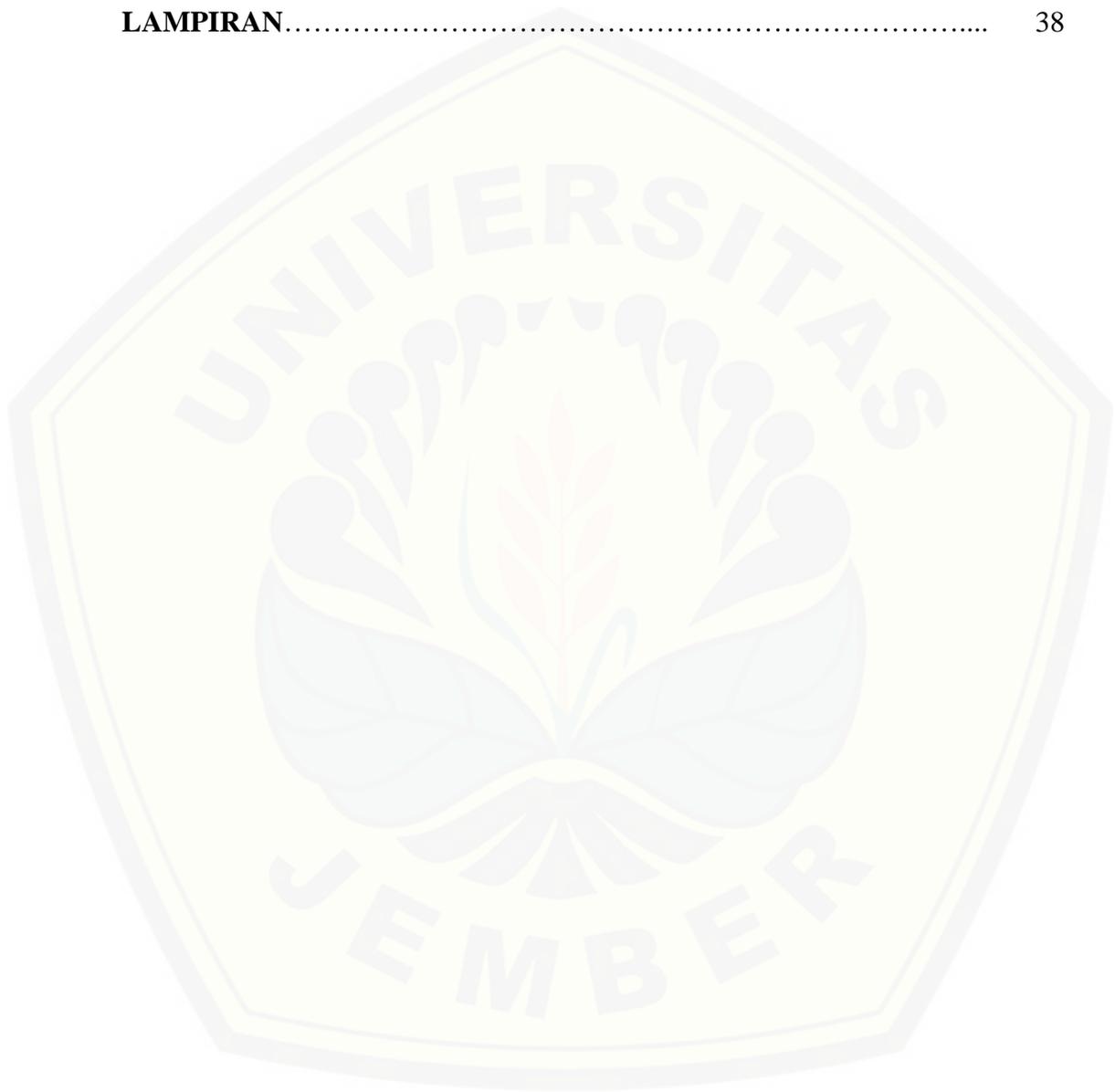
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN BIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kerusakan Tulang.....	4
2.2 Remodeling Tulang	4
2.3 Metode Remodeling Tulang.....	6
2.4 Cangkang Telur Ayam.....	9
2.5 Peran Kalsium dalam Remodeling Tulang.....	11
2.6 Kultur Primer Sel Osteoblas	12
2.7 Uji Sitotoksitas.....	13
2.8 Inhibitory Concentration (IC ₅₀).....	16

2.9 Kerangka Konsep	18
2.10 Hipotesis	19
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Tempat Penelitian	20
3.3 Waktu Penelitian	20
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian	20
3.4.1 Variabel Bebas.....	20
3.4.2 Variabel Terikat.....	20
3.4.3 Variabel Terkendali.....	20
3.5 Definisi Operasional	21
3.5.1 Ekstrak kalsium.....	21
3.5.2 Uji Sitotoksitas.....	21
3.5.3 Sel Osteoblas	21
3.6 Pengelompokan Sampel Penelitian	21
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	22
3.7.1 Alat Penelitian	22
3.7.2 Bahan Penelitian	23
3.8 Prosedur Penelitian	23
3.8.1 Prosedur Kultur Primer Sel Osteoblas.....	23
3.8.2 Prosedur Panen Sel dan Perhitungan Sel.....	23
3.8.3 Prosedur Uji Sitotoksitas MTT <i>assay</i>	24
3.8.4 Pengamatan Hasil.....	25
3.8.5 Perhitungan IC ₅₀	26
3.9 Analisis Data	26
3.10 Alur Penelitian	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	28
4.2 Pembahasan	31

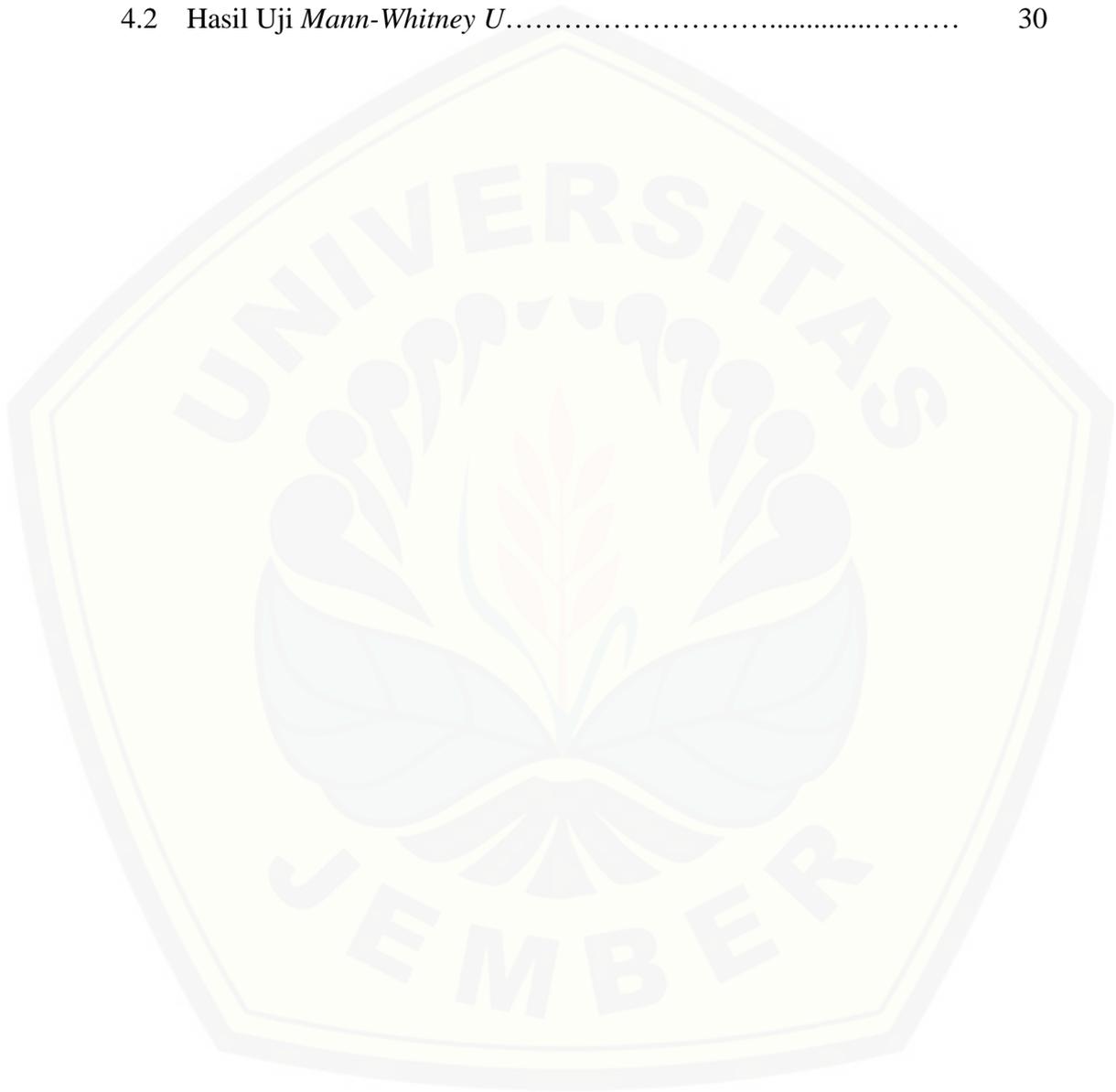
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA.....	35
LAMPIRAN.....	38



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Cangkang Telur Ayam	10
4.1 Persentase viabilitas sel osteoblas	29
4.2 Hasil Uji <i>Mann-Whitney U</i>	30

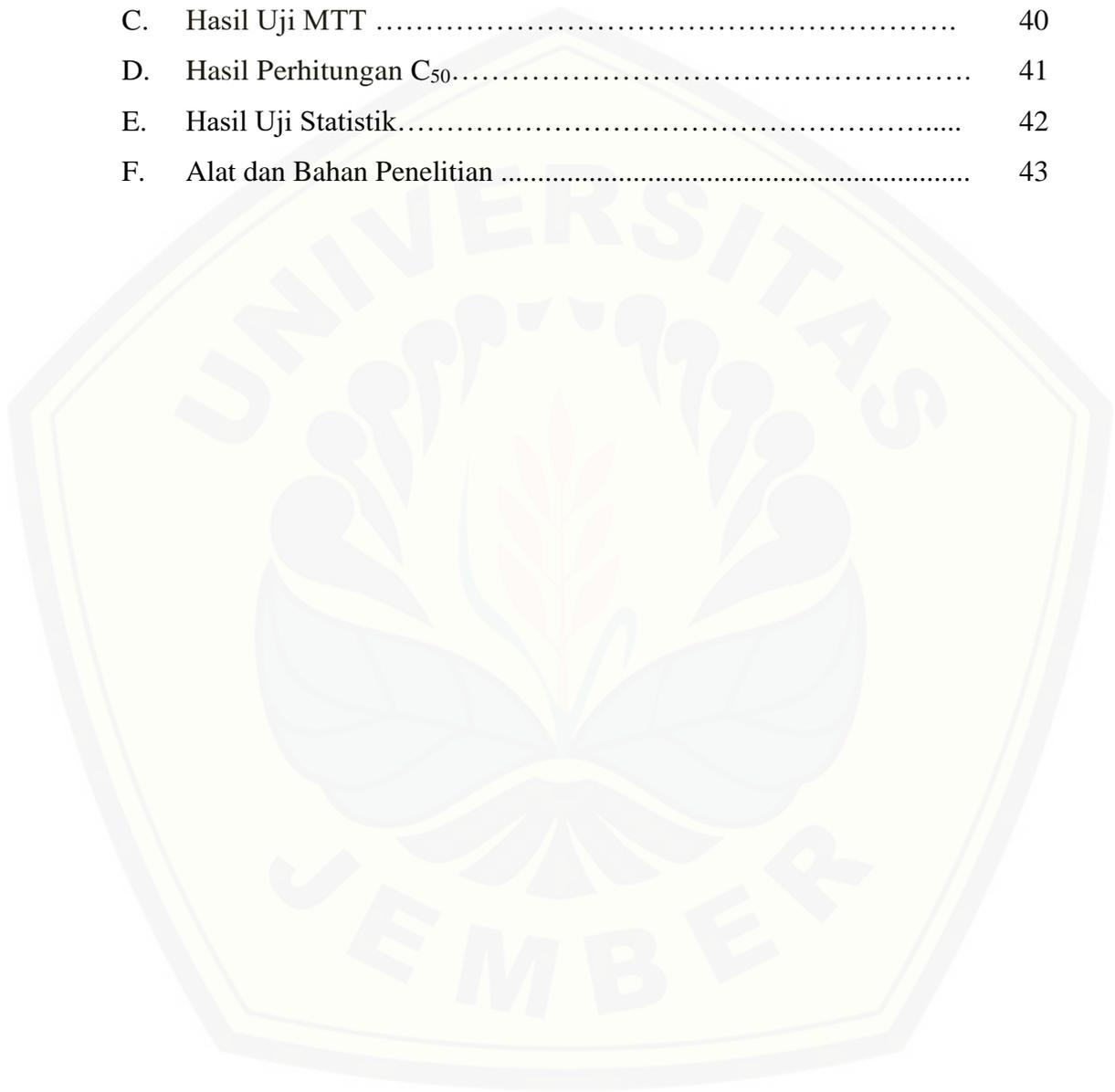


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Cangkang telur ayam	10
2.2 Gambaran histologi sel osteoblas.....	12
2.3 Prinsip MTT <i>assay</i>	15
2.4 Sel osteoblas pada kultur.....	15
4.1 Grafik pengaruh konsentrasi ekstrak kalsium cangkang telur terhadap viabilitas sel.....	29
4.2 Grafik pengaruh konsentrasi ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap persentase viabilitas sel osteoblas	30

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Ethical learance.....	38
B. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel	39
C. Hasil Uji MTT	40
D. Hasil Perhitungan C_{50}	41
E. Hasil Uji Statistik.....	42
F. Alat dan Bahan Penelitian	43



DAFTAR SINGKATAN

PGA	<i>Poly glycolic acid</i>
PLA	<i>Poly lactic acid</i>
PCL	<i>Poly e-caprolactone</i>
RER	<i>Rough endoplasmic reticulum</i>
CaSR	<i>Calcium Sensing Reseptor</i>
MTT	<i>Methylthiazol tetrazolium</i>
SDS	Sodium deodesit sulfat
DMSO	Dimetil Sulfoksida
OD	<i>Optical Density</i>
CCRC	<i>Cancer Chemoprevention Research Center</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory Concentration 50</i>
DMEM	<i>Dulbecco minimal essentials medium</i>
PBS	Phospat buffer saline
ATP	Adenosine Trifosfat
µg	Mikrogram
ml	mililiter

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kerusakan tulang di rongga mulut merupakan hal yang sering terjadi, salah satu satunya adalah keadaan pasca pencabutan gigi. Tindakan pencabutan gigi melibatkan jaringan tulang dan jaringan lunak rongga mulut (Safriani, 2014). Kerusakan jaringan keras atau tulang yang terjadi pasca pencabutan gigi dapat berupa fraktur tulang alveolar (Van der Weijden, 2009). Kondisi ini membutuhkan proses penyembuhan atau regeneratif.

Salah satu terapi regeneratif tulang yang dapat digunakan adalah *bone graft*. Bahan yang dapat digunakan dalam terapi *bone graft* adalah kalsium yang kemudian disintesis menjadi hidroksiapatit. Pengembangan terapi *bone graft* dalam kedokteran gigi dapat berasal dari penggabungan hidroksiapatit dan polimer yang kemudian membentuk komposit hidroksiapatit (Amin dan Ulfah, 2017). Salah satu metode untuk mensintesis hidroksiapatit adalah metode *wet chemical* yang menggunakan prekursor kalsium dan prekursor fosfat (Noviyanti, 2017). Selain sebagai bahan *bone graft*, kalsium dapat dimanfaatkan sebagai bahan *scaffold* dalam *tissue engineering* (Herda dan Puspitasari, 2016). Hidroksiapatit yang disintesis dari bahan alam memiliki osteokonduktivitas lebih baik dibandingkan bahan sintetik (Amin dan Ulfah, 2017). Bahan alam yang dapat digunakan sebagai sumber prekursor kalsium dalam sintesis hidroksiapatit adalah cangkang telur ayam.

Cangkang telur ayam memiliki kandungan kalsium mencapai 95%. Cangkang telur ayam dapat dimanfaatkan untuk terapi kesehatan, seperti pembuatan biomaterial substitusi tulang (Nurlaela, 2014). Industri pengolahan pangan berbahan baku telur saat ini berkembang dalam jumlah besar sehingga jumlah limbah cangkang telur ayam yang dihasilkan juga besar (Jaso, 2009). Data Direktorat Jendral Peternakan tahun 2017 menunjukkan bahwa produksi telur ayam ras dan buras di Indonesia sebesar 1.738.060 ton setiap tahun. Sekitar 10% dari telur merupakan cangkangnya, sehingga dihasilkan 173.806 ton cangkang telur ayam setiap tahun. Untuk menjaga kualitas lingkungan dan kesehatan membutuhkan cara

yang efektif dalam memanfaatkan limbah cangkang telur untuk didaur ulang atau digunakan kembali menjadi produk yang lebih berguna (Arabhosseini, 2018).

Respon sel dan jaringan merupakan kunci keberhasilan dari desain dan aplikasi biomaterial. Salah satu metode untuk mengetahui respon sel dan jaringan adalah melalui uji sitotoksitas *in vitro* dengan mengukur viabilitas sel dalam kultur (Freshney, 2005; Craig dan Powers, 2013). Penggunaan kultur sel primer lebih relevan dalam menilai sitotoksitas suatu bahan dibandingkan dengan sel sekunder karena sel primer belum mengalami transformasi yang dapat menyebabkan perubahan karakteristik sel (Craig dan Powers, 2013). Kultur sel osteoblas adalah model uji *in vitro* yang ideal untuk uji biokompabilitas dan *osseointegration* (Khrunyk, 2017). Osteoblas merupakan sel yang bertanggungjawab dalam proses pembentukan tulang. Proliferasi dan diferensiasinya memainkan peran penting dalam proses osteogenesis (Liu, 2019). Kultur sel osteoblas pada prosedur ini menggunakan osteoblas yang didapat dari kalvaria tikus karena osteoblas yang berasal dari kalvaria tikus mudah untuk diperoleh dan dapat digunakan sebagai model alternatif untuk penelitian *in vitro* (Czekanska, 2012). Berdasarkan uraian tersebut, penulis ingin meneliti tentang uji sitotoksitas ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap kultur sel primer osteoblas .

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana uji sitotoksitas ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap viabilitas sel osteoblas ?
2. Berapa konsentrasi optimal ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap viabilitas sel osteoblas ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui dan mengkaji sitotoksisitas ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap viabilitas sel osteoblas .
2. Menetapkan konsentrasi optimal ekstrak kalsium cangkang telur ayam terhadap viabilitas sel osteoblas .

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memberikan informasi tentang pemanfaatan kandungan limbah cangkang telur ayam.
2. Mengembangkan penelitian tentang pemanfaatan kandungan limbah cangkang telur ayam.
3. Memberikan informasi tentang sitotoksisitas ekstrak kalsium cangkang telur ayam
4. Memberikan informasi tentang konsentrasi optimum ekstrak kalsium cangkang telur ayam

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kerusakan Tulang

Kerusakan tulang di kedokteran gigi bisa disebabkan karena proses pencabutan gigi. Umumnya, soket yang terbentuk karena ekstraksi dapat sembuh tanpa gangguan. Jika penyembuhan yang tidak kunjung selesai, hanya sebagian defek alveolar akibat pencabutan gigi yang akan pulih. Proses resorpsi alveolar juga dapat terjadi bersamaan dengan pertumbuhan tulang ke dalam soket. Jumlah kehilangan tulang terbesar dalam dimensi horizontal dan terjadi terutama pada aspek fasial pada *ridge*. Ada juga kehilangan ketinggian *vertical ridge*, yang banyak terjadi pada aspek bukal. Proses resorpsi ini menghasilkan *ridge* yang lebih sempit dan lebih pendek dan efek dari pola resorptif ini adalah relokasi *ridge* ke posisi yang lebih palatal/lingual. Cacat yang dihasilkan dari hilangnya gigi mungkin menjadi rumit karena keroposnya tulang oleh penyakit periodontal, lesi endodontik, atau traumatik. Proses penyembuhan menjadi semakin terganggu ketika tulang alveolar kehilangan ketebalan atau ketinggian (Van der Weijden, 2009).

Menurut Van der Weijden (2009), hilangnya tulang alveolar mungkin telah terjadi sebelum pencabutan gigi karena penyakit periodontal, patologi periapikal, atau trauma pada gigi dan tulang. Aktivitas resorpsi tulang di sisa *ridge* berlanjut sepanjang hidup pada tingkat yang lebih lambat yang mengakibatkan penghilangan struktur rahang dalam jumlah besar. Kondisi ini memerlukan proses remodeling tulang

2.2 Remodeling Tulang

Remodeling didefinisikan sebagai perbaikan internal dari tulang. Proses regeneratif atau *bone turnover* ditandai dengan pelepasan kalsium dari fase mineral tulang dan penggabungannya ke dalam kristal tulang dan terjadi dalam jangka waktu yang lama. Proses ini disebabkan oleh penyerapan osteoklas, yang menginduksi pelepasan kalsium, dan membentuk osteoblas, dan mengambilnya kembali untuk mempertahankan homeostasis. Penelitian terbaru menunjukkan

bahwa kalsium ekstraseluler memainkan peran penting dalam mengatur proliferasi dan diferensiasi osteoblas (Gabusi, 2012).

Menurut Khullar dkk. (2012), proses penyembuhan tulang setelah dilakukannya pencabutan gigi hampir sama dengan penyembuhan luka biasa dengan proses yang berurutan sebagai berikut:

1. *The Granulation Stage*

Tahap granulasi terjadi selama 5 hari dari waktu ekstraksi. Jaringan granulasi terlihat di dasar soket dan memanjang pada dinding soket. Bekuan darah menempati bagian tengah soket. Angiogenesis yang paling awal diamati adalah ekstensi dari pembuluh darah kapiler sinusoidal yang sudah ada sebelumnya yang berkembang dari ujung-ujung pembuluh darah yang pecah di sisa ligamen periodontal pada pelat *cribiform*. Pembuluh darah sinusoid adalah pembuluh darah kecil yang merupakan jenis kapiler serupa endotelium berfenestra. Angiogenesis ini dimulai di dasar soket yang tebal, trabekula yang kuat sudah ada dan bersama dengan pleksus *capillary*. Ini adalah area di dasar soket yang terluka paling sedikit selama pencabutan gigi dan mempertahankan pola pembuluh darahnya secara utuh, yang pada awalnya merupakan area yang paling aktif.

2. *Initial Angiogenic/Neurovascularization Stage*

Periode ini terjadi selama 1 minggu dari waktu ekstraksi. Bekuan darah menjadi lebih kecil. Sinusoid baru yang terbentuk di sepanjang dinding soket. Di dasar soket, tulang trabekula yang baru terbentuk dapat diamati.

3. *New Bone Formation Stage*

Fase ini terjadi 2 minggu setelah waktu ekstraksi. Seluruh soket diisi dengan jaringan granulasi yang penuh dengan sinusoid. Dinding dan dasar soket menunjukkan bentukan trabekula padat. Rangkaian tulang digambarkan oleh trabekula yang tidak terosifikasi dengan sempurna. Pembentukan trabekula tulang diatur oleh ekspansi dan lokasi sinusoid. Kegiatan ini mencapai puncaknya pada minggu ke-2 setelah pencabutan gigi dan perkembangan tulang menjadi cepat.

4. *Bone Growth Stage*

Fase ini terjadi saat 4-5 minggu setelah pencabutan gigi. Trabekula yang ada di dasar serta dinding soket menebal lalu menempati sekitar dua pertiga dari volume soket asli. Spongiosa mulai berkembang.

5. *Bone reorganization Stage*

Tahap ini terjadi 6 minggu setelah pencabutan gigi. Spongiosa berkembang menjadi lebih besar dimulai dari area pangkal soket yang kemudian memanjang ke atas.

2.3 Metode Remodeling Tulang

Menurut Jimi dkk. (2012) ada beberapa metode remodeling tulang di bidang kedokteran gigi untuk saat ini, diantaranya adalah:

1. *Bone Grafts dan Artificial Bone Materials*

Bone graft adalah prosedur pembedahan untuk menggantikan tulang yang hilang dengan bahan dari tubuh pasien sendiri, sintetis, atau alami. *Bone graft* berpotensi untuk digunakan karena jaringan tulang memiliki kemampuan untuk regenerasi sepenuhnya jika disediakan ruang di mana ia harus tumbuh. Saat tulang alami tumbuh, umumnya menggantikan bahan graft sepenuhnya, menghasilkan daerah yang sepenuhnya terintegrasi tulang baru (Kumar, 2013).

Mekanisme biologi yang berperan dalam terapi *bone graft* antara lain osteokonduksi, osteoinduksi, osteogenesis. Osteokonduksi terjadi ketika material *bone graft* menyediakan *scaffold* yang memadai untuk deposisi tulang baru. Osteoblas memanfaatkan bahan *bone graft* sebagai kerangka kerja untuk menyebar dan menghasilkan tulang baru. Osteoinduksi melibatkan stimulasi sel osteoprogenitor untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas yang kemudian memulai pembentukan tulang baru. Jenis mediator sel osteoinduktif yang paling banyak dipelajari adalah protein morfogenetik tulang (*bone morphogenetic protein*). Bahan *bonegraft* yang bersifat osteokonduktif dan osteoinduktif tidak hanya berfungsi sebagai perancah untuk osteoblas yang ada saat ini namun juga akan memicu

pembentukan osteoblas baru, yang secara teoritis mendorong proses integrasi cangkok tulang lebih cepat. Osteogenesis adalah sel tulang yang hidup dan berkontribusi pada proses *remodelling* tulang (maturasi sel tulang). Osteogenesis adalah pembentukan sel tulang yang hidup dan berkontribusi pada proses *remodelling* tulang. Osteogenesis terjadi ketika osteoblas aktif yang berasal dari bahan *bone graft* berkontribusi terhadap pertumbuhan tulang baru bersamaan dengan pertumbuhan tulang yang dihasilkan melalui dua mekanisme lainnya (osteokonduktif dan osteoinduksi) (Kumar, 2013).

Terdapat beberapa jenis *bone graft* yaitu *autograft*, *allograft*, dan material sintetis *alloplast* (Kumar, 2013). *Autograft* adalah *bone graft* yang berasal dari *host* itu sendiri. Teknik ini memiliki kerugian seperti prosedur operasi tambahan yang menyebabkan trauma, dan keterbatasan jumlah material yang tersedia. *Allograft* adalah *bone graft* yang berasal dari donor yang spesiesnya sama. *Xenograft* adalah *bone graft* yang berasal dari donor yang berbeda spesies. Kekurangan dari kedua material ini yaitu rendahnya vaskularisasi, lemahnya sel, tingginya tingkat resorpsi, reaksi imunologi, resiko kontaminasi. *Alloplast* atau *alloimplant* merupakan material yang dapat digunakan sebagai bahan regenerasi jaringan. Material *alloplast* harus memiliki karakteristik sama dengan tulang. Material *alloplast* dapat berasal dari bahan sintetis non-logam yang diperoleh dari bahan keramik (kalium fosfat), komposit dan polimer. Salah satu bahan biokeramik yang sering digunakan dalam aplikasi biomedis sebagai bahan terapi substitusi tulang atau *bone graft* adalah hidroksiapatit sintetis $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Susunan kristal hidroksiapatit memiliki gambaran identik dengan hidroksiapatit pada tulang. Material ini bersifat biokompatibel, osteokonduktif, serta dapat menyatu dengan tulang sehingga dapat meningkatkan proses regenerasi tulang (Bowo, 2011).

2. *Guided Bone Regeneration* (GBR)

Guided Bone Regeneration (GBR) mendorong pertumbuhan tulang baru untuk menggantikan area kerusakan pada rahang dan dapat digunakan bersamaan dengan *guided tissue regeneration* (GTR) untuk membangun kembali jaringan lunak di mulut pasien. GBR melibatkan epitel dan eksklusi jaringan ikat dan penciptaan ruang untuk memungkinkan sel-sel ligamen periodontal untuk terisi kembali ke permukaan akar dan memungkinkan sel-sel tulang tumbuh ke daerah yang cacat tersebut. Meskipun metode ini menginduksi regenerasi tulang, dibutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan volume tulang yang cukup dalam banyak kasus.

Proses penyembuhan dalam *guided bone regeneration* menggunakan aplikasi membran *barrier*. Jenis membran *barrier* terbagi menjadi 2, yaitu *resorbable* dan *non-resorbable*. ‘*Gold standard*’ membran *non-resorbable* pada prosedur GBR adalah: 1. *Expanded Highdensity polytetrafluoroethylene*, Cytoplast, TXT-200, Osteogenics Biomedical, Lubbock, USA); 2. *Titanium-reinforced highdensity polytetrafluoroethylene* (misalnya Cythoplast Ti-250, Osteogenics Biomedical, Lubbock, USA); 3. *Titanium-mesh* (*Ti-mesh*). Kerugian dari *non-resorbable membrane barrier*, dibutuhkan pembedahan tambahan untuk mengambil membran *barrier*, dengan berimplikasi tidak hanya terdapat nyeri tambahan tetapi juga ketidaknyamanan dan beban ekonomi pada pasien. Untuk mengeliminasi prosedur bedah kedua, dikembangkan membran yang dapat diresorpsi.

Membran *barrier resorbable* merupakan mayoritas membran sintesis polimer yang dapat diresorpsi untuk regenerasi periodontal yang beredar di pasaran berbahan dasar poliester atau *tissue-derived collagens*. Membran yang berbahan dasar polyester misalnya *poly (glycolic acid)* (PGA), *poly (lactic acid)* (PLA), *poly (ε-caprolactone)* (PCL) dan polimer-polimernya. Sifat-sifat membran poliester: biokompatibel (dapat diterima tubuh) biodegradable (dapat didegradasi tubuh), mudah dalam penanganan secara klinis dan memungkinkan terjadinya *tissue integration*. Rata-rata kecepatan resorpsi menjadi penting, setidaknya 4-6 minggu waktu yang

dibutuhkan untuk berhasil terjadinya regenerasi dari sistem periodontal. Pada umumnya biodegradasi dari poliester-poliester ini melibatkan proses perpecahan nonenzimatik dari *PGA* dan *PLA* menjadi piruvat dan asam laktat, yang merupakan produk akhir dari pencernaan karbohidrat. Walaupun membran-membran ini menunjukkan kekuatan inisial yang tinggi (~12-14 MPa), membran-membran ini hampir kehilangan sifat-sifat struktur dan mekaniknya dalam empat minggu setelah inkubasi dalam medium kultur. Kekuatan maksimum setelah 14 hari terpapar akan menurun secara signifikan (di bawah 1 MPa). Kerugian utama dari membran yang dapat diresorpsi ini adalah tidak dapatnya diprediksi waktu resorpsi serta derajat degradasinya, yang berpengaruh langsung pada pembentukan tulang. Membran yang ideal harus dapat didegradasi atau diresorpsi dengan kecepatan yang sama dengan terjadinya pembentukan tulang (Cahaya, 2015).

Menurut Cahaya (2015) menjelaskan bahwa pada penelitian terdahulu telah dilakukan penelitian mengembangkan membran *barrier guided bone regeneration* dengan menggabungkan polimer sintesis dan alami. *Barrier* dalam penelitian tersebut dibuat dengan penambahan obat terapi dan atau faktor pertumbuhan dan atau kalsium. Hasil penelitian menjelaskan bahwa metode tersebut menghasilkan membran *barrier* dengan potensial klinis yang rendah karena densitas yang tinggi sehingga sulit penanganannya dan heterogen kecepatan degradasinya.

2.4 Cangkang Telur Ayam

Telur merupakan makanan yang banyak di konsumsi di Indonesia sehingga membuat potensi limbah cangkang telur ayam di Indonesia cukup besar. Menurut data Direktorat Jendral Peternakan tahun 2017, produksi telur ayam ras dan buras di Indonesia sebesar 1.738.060 ton pertahun. Sekitar 10% dari telur merupakan cangkangnya, sehingga dihasilkan 173.806 ton cangkang telur ayam pertahunnya. Sehingga cangkang telur ayam merupakan limbah dapur yang berpotensi untuk dimanfaatkan karena sejauh ini belum dimanfaatkan secara optimal.

Cangkang telur ayam merupakan lapisan luar dari telur yang berfungsi melindungi semua bagian telur dari luka atau kerusakan. Bila dilihat dengan mikroskop maka cangkang telur terdiri dari 4 lapisan yaitu: lapisan kutikula merupakan protein transparan yang melapisi permukaan kulit telur. Lapisan ini melapisi pori-pori pada kulit telur, tetapi sifatnya masih dapat dilalui gas sehingga keluarnya uap air dan gas CO^2 masih dapat terjadi. Lapisan busa, lapisan ini merupakan bagian terbesar dari lapisan kulit telur. Lapisan ini terdiri dari protein dan lapisan kapur yang terdiri dari kalsium karbonat, kalsium fosfat, magnesium karbonat dan magnesium fosfat. Lapisan mamillary, lapisan ini merupakan lapisan ketiga dari kulit telur yang terdiri dari lapisan yang berbentuk kerucut dengan penampang bulat atau lonjong. Lapisan ini sangat tipis dan terdiri dari anyaman protein dan mineral. Lapisan membran merupakan bagian lapisan kulit telur yang terdalam. Terdiri dari dua lapisan selaput yang menyelubungi seluruh isi telur. Cangkang telur ayam mengandung hampir 95,1% terdiri atas garam – garam anorganik, 3,3% bahan organik (terutama protein) dan 1,6% air. (Jaso, 2009).

Tabel 2.1. Tabel komposisi cangkang telur ayam

Komposisi	Berat (%)
Kalsium karbonat	94
Magnesium karbonat	1
Kalsium fosfat	1
Bahan organik	4

Sumber: Jaso, 2009

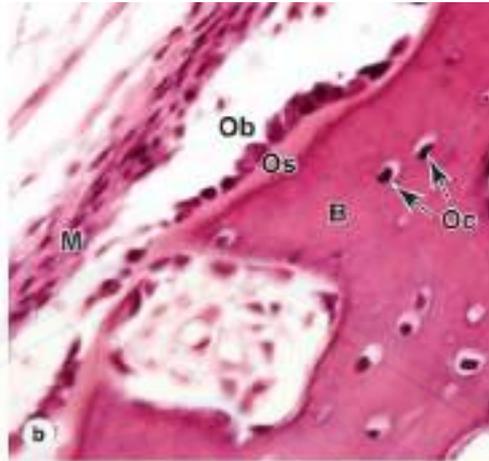


Gambar 2.1 Cangkang telur ayam (Sumber: <http://style.tribunnews.com>, 2017)

2.5 Peran Kalsium dalam Remodeling Tulang

Selama transformasi tulang, terjadi perubahan konsentrasi kalsium ekstraseluler. Hampir 20% permukaan tulang mengalami remodeling pada waktu tertentu, sedangkan sisanya, 80%, diam. Proses regeneratif atau *bone turnover* ditandai dengan pelepasan kalsium dari fase mineral tulang dan penggabungannya ke dalam kristal tulang dan terjadi dalam jangka waktu yang lama, dalam hitungan. Proses-proses ini terutama disebabkan oleh penyerapan osteoklas, yang menginduksi pelepasan kalsium, dan membentuk osteoblas, dan mengambilnya kembali untuk mempertahankan homeostasis. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa kalsium ekstraseluler memainkan peran penting dalam mengatur proliferasi dan diferensiasi osteoblas (Gabusi, 2012).

Osteoblas merupakan sel pembentuk tulang yang bertanggung jawab terhadap proses mineralisasi matriks tulang dengan cara mensekresi kolagen tipe I dan melepaskan kalsium, magnesium, dan ion fosfat. Osteoblas adalah sel basofilik, mononuklear (berdiameter 15-30 μm) dengan nukleus bulat besar, *rough endoplasmic reticulum* (RER), apparatus golgi, dan mitokondria. Bila sedang mensintesis matriks tulang, osteoblas berbentuk kuboid dan mempunyai suatu sitoplasma yang basofilik. Bila kegiatan sintesis sedang tidak aktif, menjadi gepeng atau pipih dan sifat basofilik sitoplasmanya berkurang. Osteoblas terletak pada permukaan jaringan tulang dan secara berdampingan, dalam suatu cara yang menyerupai epitel sederhana. Osteoblas juga mengandung sejumlah besar aktin, myosin, dan protein sitoskeletal yang memungkinkan pemeliharaan bentuk sel dan memfasilitasi perlekatan sel. Sebagian osteoblas akan berubah menjadi osteosit dan sebagian yang lainnya akan berada di permukaan periosteal atau endosteal tulang (*lining cell*) dengan karakteristik berbentuk pipih dan beberapa osteoblas berbentuk persegi panjang pada proses pembentukan tulang (Jayakumar, 2010).



Gambar 2.2 Gambaran histologi sel osteoblast. (M) Jaringan mesenkim, (Ob) Osteoblas, (Os) Osteoid, (B) Matriks tulang, (Oc) Osteosit. H&E, perbesaran 300x (Sumber: Junqueira, 2013).

Konsentrasi kalsium ekstraseluler dapat memainkan peran fisiologis dalam mengatur remodeling tulang secara independen dari hormon *calciotropic* melalui aktivasi reseptor *calciumsensing* (CaSR) di osteoblas. Kalsium ekstraseluler terionisasi bebas adalah pengatur kuat perilaku *stem cell*, mineralisasi, dan molekul sinyal penting dalam tulang. Telah dilaporkan bahwa konsentrasi kalsium terionisasi bebas *in vivo* mencapai 40mM di lokasi resorpsi osteoklastik (lebih dari 20 kali lipat yang diamati dalam serum) dan konsentrasi kalsium ini secara langsung menghambat fungsi osteoklas (Gabusi, 2012).

2.6 Kultur Primer Sel Osteoblas Tulang

Kultur sel merupakan proses penghilangan atau perpindahan sel dari manusia, hewan, atau tanaman ke dalam medium terkontrol yang sesuai untuk menumbuhkan sel tersebut. Keuntungan kultur sel adalah dapat dilakukannya manipulasi fisikokimia (seperti suhu, pH, teknik osmotik, kadar O^2 dan CO^2), manipulasi lingkungan fisiologis (seperti hormon, dan konsentrasi *nutrient*) sel saat berkembang biak, dan keuntungan besar lainnya adalah homogenitas sel dan kontrol penuh myogenesis (Khumairoh dan Puspitasari, 2016).

Terdapat dua jenis kultur sel yaitu kultur sel primer dan sel sekunder. Kultur sel primer merupakan kultur yang dimulai dari sel, jaringan, organ yang diperoleh

langsung dari organisme asalnya, sedangkan kultur sel sekunder ialah kultur yang diperoleh dari subkultur pertama dari kultur primer (Ma'at, 2011). Penggunaan kultur sel primer dalam uji sitotoksitas lebih relevan dibanding kultur sel sekunder karena sel primer belum mengalami transformasi yang menyebabkan perubahan karakteristik sel (Craig dan Powers, 2013).

Proses pembentukan, penyembuhan tulang melibatkan berbagai jenis sel. Kemajuan dalam pemahaman biologi sel osteoblas selama ini melalui penggunaan dari berbagai model kultur *in vitro* dari asal yang berbeda. Model sel ini semakin sering diterapkan karena terbatasnya ketersediaan sel osteoblas manusia primer. Karena terbatasnya aksesibilitas sel-sel osteoblas manusia dan fenotip yang heterogen, sel bisa diisolasi dari spesies lain sehingga memberikan alternatif model penelitian *in vitro*. Penggunaan model osteoblas ini memberikan kelebihan dan kekurangan yang perlu dipertimbangkan. Spesimen untuk isolasi sel bisa lebih mudah diperoleh dari hewan, seperti kalvaria. Kelebihan sel primer osteoblas tikus adalah mudah tersedianya tikus yang digunakan untuk pengambilan sel, memudahkan untuk mengontrol pemilihan tikus, ekstraksi sel bisa dari semua tulang dalam kerangka tulang. Kekurangan sel osteoblas tikus adalah perbedaan antar spesies, perbedaan genetik, sel fenotip sensitif terhadap usia dan tempat isolasi. (Czekanska, 2012).

2.7 Uji Sitotoksitas

Respon sel dan jaringan merupakan faktor kunci keberhasilan dari desain dan aplikasi suatu biomaterial. Salah satu cara mengetahui respon sel dan jaringan adalah dengan mengukur sitotoksitas secara *in vitro*. Sitotoksitas *in vitro* dapat memberikan gambaran tentang potensi masalah dengan jaringan lokal sebelum menyelidiki secara *in vivo*. Uji sitotoksitas juga bertujuan untuk menentukan konsentrasi proporsional dari suatu material sehingga tidak mengurangi biokompabilitas oleh karena adanya pelepasan komponen yang beracun atau mengiritasi (Wang dkk., 2013).

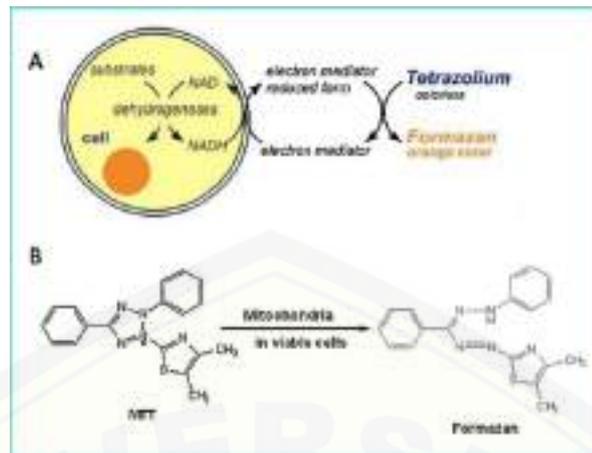
Doyle dan Griffiths (2000) menguraikan bahwa uji sitotoksitas ada dua macam yaitu:

1. Kuantitatif, yaitu mencari LC_{50} , IC_{50} dan presentase kematian sebagai parameter ketoksikan yang merupakan gambaran senyawa uji dalam menyebabkan kematian sel.
2. Kualitatif, dilakukan dengan pengamatan morfologi sel di bawah mikroskop setelah sel diberi perlakuan dengan senyawa uji. Pengamatan meliputi perubahan bentuk sel pada kontrol dan perlakuan.

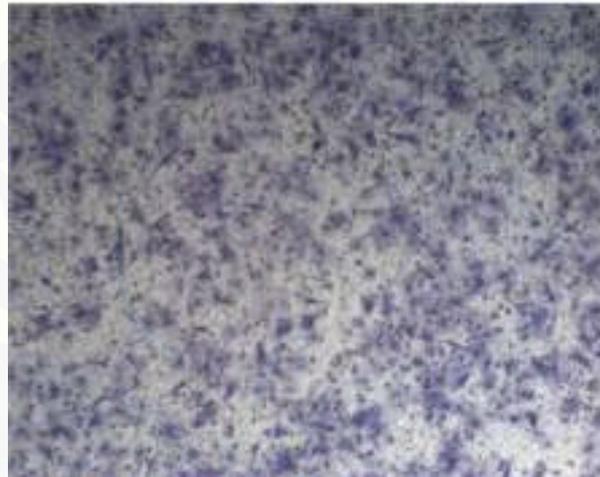
Uji sitotoksitas secara *in vitro* dapat dilakukan dengan kultur sel baik primer maupun sekunder. Efek sitotoksik bahan dapat dinilai dengan melakukan pengukuran terhadap (Craig dan Powers, 2013):

1. Viabilitas sel dalam kultur berdasarkan pada perubahan integritas permeabilitas membran sel.
2. Viabilitas sel berdasarkan aktivitas enzimatis atau biosintesis sel yaitu uji terhadap metabolisme atau fungsi sel.
3. Jumlah sel atau proliferasi sel ditandai dengan jumlah sel yang bertambah dan tetap melekat atau adanya daerah hambatan (*inhibited zone*) setelah bahan dipaparkan dalam kultur sel.
4. Respons sitotoksik tidak langsung (*indirect*) yaitu dengan menggunakan *barrier* yang ditempatkan antara sel dan bahan yang diuji.

Salah satu metode uji sitotoksitas bahan kedokteran gigi yang sering digunakan adalah MTT-*assay*. Penelitian ini menggunakan uji MTT-*assay* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) untuk mengukur viabilitas, proliferasi, dan aktivasi sel. Uji MTT dilakukan berdasarkan kapasitas enzim suksinat dehidrogenase di dalam mitokondria. Enzim tersebut merupakan ikatan kompleks enzim yang berperan dalam siklus asam sitrat dengan mentransfer elektron saat mengkonversi suksinat menjadi fumarat pada proses metabolisme di dalam sel. Suksinat dehidrogenase inilah yang mengubah garam kuning larut air *methylthiazol tetrazolium* (MTT) menjadi kristal formazan berwarna biru tua keunguan yang tidak larut dalam air pada uji sitotoksitas dengan MTT-*assay* (Duval dkk., 2012; Doyle dan Griffiths, 2000).



Gambar 2.3 Prinsip MTT-Assay (a) dan; Perubahan struktur kimia dari *methylthiazol tetrazolium* (MTT) ke formazan (b) (Sumber: Duval dkk, 2012)



Gambar 2.4. Sel Osteoblas pada kultur (Li, 2016)

Kristal formazan yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan *stopper reagent* berupa sodium dodesit sulfat (SDS) atau dimetil sulfoksida (DMSO) atau isopropanol yang diasamkan untuk menghentikan reaksi MTT. *Optical density* (OD) atau nilai absorbansi kristal formazan yang telah dilarutkan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer (*ELISA reader* atau *microplate reader*) dengan panjang gelombang tertentu (Siregar dan Hadijono, 2000). Intensitas warna biru tua keunguan dari kristal formazan yang terbentuk jumlahnya sebanding dengan aktivitas sel yang hidup. Jika intensitas warna ungu semakin besar, berarti jumlah sel hidup semakin banyak (CCRC, 2017).

Sensitivitas uji sitotoksitas metode MTT-*assay* tergantung pada tipe sel, status metabolik serta teknik melarutkan kristal formazan. Kelemahan metode ini

antara lain nilai absorbansi absolut tidak sama pada berbagai galur sel sehingga sebaiknya dilakukan uji pendahuluan dan perbandingan dengan uji sitotoksitas lainnya. Uji sitotoksitas juga tidak dapat diaplikasikan untuk sampel yang berwarna pekat, karena akan menyerap sinar *visible* sehingga absorbansi yang diperoleh menjadi lebih besar dan hasil pengamatan uji sitotoksitas menjadi tidak valid (Siregar dan Hadijono, 2000).

Data absorbansi yang didapat dari pembacaan oleh *ELISA reader* kemudian dikonversi ke dalam persen viabilitas sel dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipajang dengan bahan uji dengan kelompok kontrol (sampel tanpa bahan uji) (CCRC, 2017). Berdasarkan ISO 10993-5 (2009), suatu bahan dikatakan mempunyai potensi sitotoksik apabila viabilitas sel berkurang hingga <70%. Heravi dkk. (2013) mengelompokkan tingkat toksisitas suatu bahan menurut klasifikasi jumlah sel yang hidup yaitu:

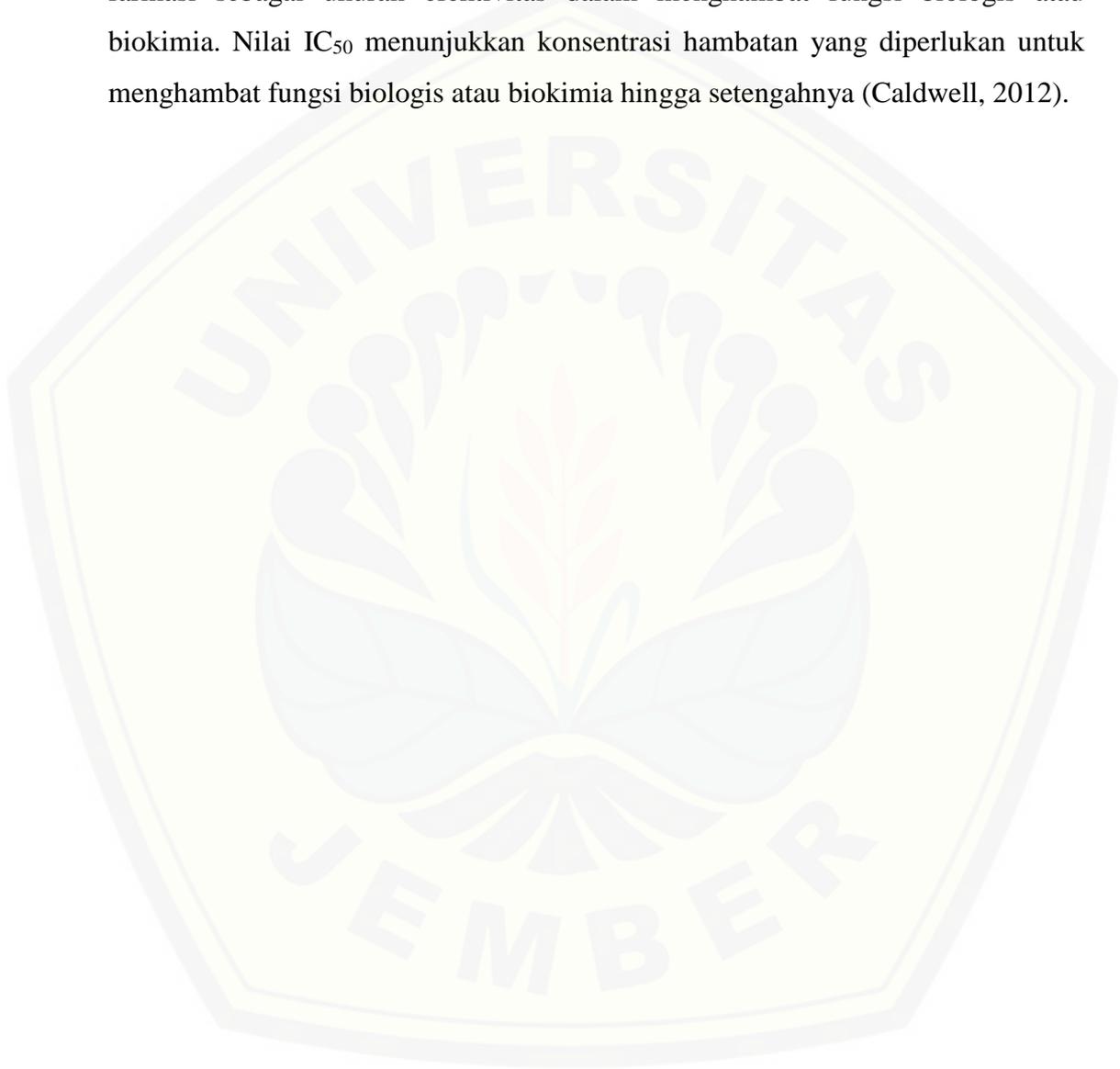
- a. Sel yang hidup lebih dari 90% dapat diklasifikasikan sebagai non-toksik.
- b. Sel yang hidup diantara 60% hingga 90% dapat diklasifikasikan sebagai sedikit toksik.
- c. Sel yang hidup diantara 30% hingga 59% dapat diklasifikasikan sebagai cukup toksik.
- d. Sel yang hidup kurang dari 30% dapat diklasifikasikan sebagai sangat toksik.

2.8 Inhibitory Concentration (IC₅₀)

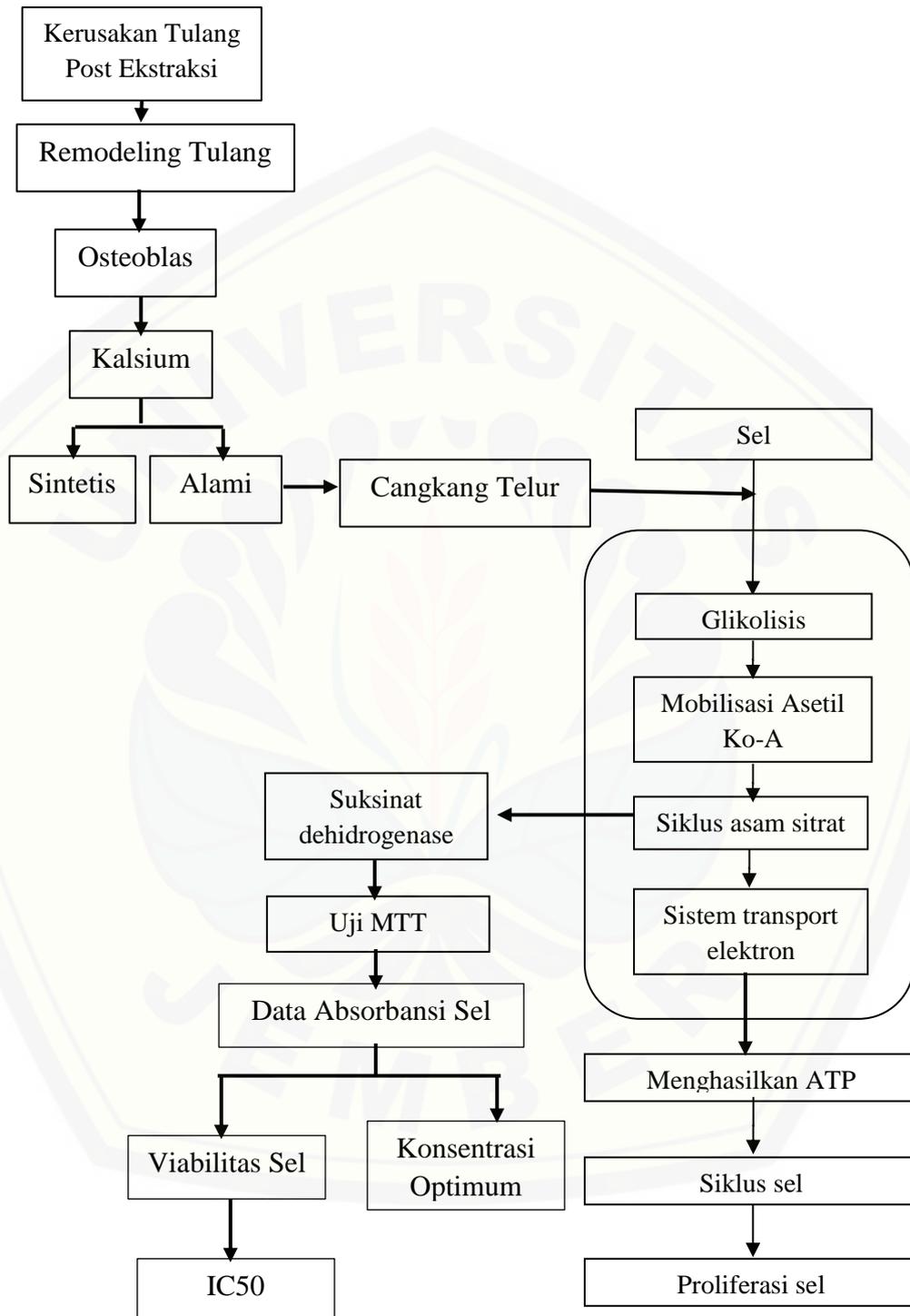
Evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis disebut uji sitotoksitas. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji sitotoksitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan sejumlah sel serta informasi yang didapat dari kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo* (CCRC, 2017).

Sitotoksitas dinyatakan sebagai rata-rata persentase kenaikan terhadap kontrol yang tidak dipapar dan nilai toksisitas kontrol ditetapkan pada 0%. Data

sitotoksitas dipasang grafik regresi linier yang digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} , yang merupakan konsentrasi bahan yang menyebabkan penghambatan 50% dibandingkan dengan kontrol (Sebaugh, 2011). Konsep dari konsentrasi yang dapat menghambat setengah pertumbuhan sel (IC_{50}) secara luas digunakan dalam dunia farmasi sebagai ukuran efektivitas dalam menghambat fungsi biologis atau biokimia. Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi hambatan yang diperlukan untuk menghambat fungsi biologis atau biokimia hingga setengahnya (Caldwell, 2012).



2.9 Kerangka Konsep



2.10 Hipotesis

Ekstrak kalsium cangkang telur ayam dapat mempertahankan viabilitas dengan baik terhadap sel osteoblas .



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah observasional analitik, yaitu penelitian melalui pengamatan kemudian dilakukan analisis perbandingan satu kelompok dengan kelompok lainnya (Swarjana, 2012).

3.2 Tempat Penelitian

Kultur sel osteoblas dan uji MTT (3-(4,5-dimetilitiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide) dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

3.3 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September – November 2018

3.4 Identifikasi Variabel penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak kalsium cangkang telur ayam konsentrasi 150 µg/ml, dan 75 µg/ml, 37,5 µg/ml, 18,75 µg/ml, 9,375 µg/ml, 4,68 µg/ml, 2,34 µg/ml (Cheng, 2013).

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah sel osteoblas yang hidup.

3.4.3 Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah kultur sel osteoblas

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Ekstrak kalsium

Ekstrak kalsium merupakan stok ekstrak kalsium berupa serbuk berwarna putih yang dihasilkan dari ekstraksi cangkang telur ayam buras.

3.5.2 Uji sitotoksitas

Uji sitotoksitas adalah uji *in vitro* toksisitas biomaterial dengan menggunakan kultur sel osteoblas. Uji sitotoksitas yang dilakukan menggunakan metode MTT *assay* yang kemudian dibaca *optical density* nya dengan ELISA *reader* pada $\lambda 595$ nm. Hasil pengukuran didapatkan nilai absorbansi yang kemudian dikonversikan ke dalam rumus viabilitas sel.

3.5.3 Sel osteoblas

Sel osteoblas merupakan sel yang berasal dari stok kultur primer sel osteoblas yang berasal dari jaringan kalvaria tikus sehat yang terdapat di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.5.4 Kultur Sel Primer

Kultur sel primer adalah sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organ melalui pemotongan jaringan normal dan dikultur. Penggunaan kultur sel primer lebih relevan dalam menilai sitotoksitas suatu bahan karena sel primer belum mengalami transformasi yang dapat menyebabkan perubahan karakteristik sel.

3.6 Pengelompokan Sampel Penelitian

- 1) Kelompok I merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 150 $\mu\text{g/ml}$.

- 2) Kelompok II merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 75 $\mu\text{g/ml}$.
- 3) Kelompok III merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 37,5 $\mu\text{g/ml}$
- 4) Kelompok IV merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 18,75 $\mu\text{g/ml}$
- 5) Kelompok V merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 9,375 $\mu\text{g/ml}$
- 6) Kelompok VI merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 4,68 $\mu\text{g/ml}$
- 7) Kelompok VII merupakan kelompok perlakuan berisi sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan konsentrasi 2,34 $\mu\text{g/ml}$
- 8) Kelompok sel merupakan kelompok yang berisi media kultur dan sel osteoblas yang tidak dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam.

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat Penelitian

1. *Handscoon*
2. Masker
3. Inkubator
4. Mikropipet multichannel
5. Tip kuning
6. ELISA reader $\lambda 595 \text{ nm}$
7. Tanur
8. Desikator

9. Timbangan

3.7.2 Bahan Penelitian:

1. Ekstrak kalsium cangkang telur ayam
2. Air Distilasi
3. Stopper reagent: Sodium deodesil sulfat (SDS) 10% dalam 0,1N HCl
4. Kultur sel osteoblas
5. Media kultur: DMEM (*Dulbecco Minimal Essentials Medium*)
6. MTT (3-(4,5-dimetilitiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide)
7. Tripsin 0,25%
8. PBS (*Phospat Buffer Saline*)

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Prosedur Kultur Primer Sel Osteoblas

Kultur primer sel osteoblas didapatkan dari stok yang sudah ada di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada.

3.8.2 Prosedur Panen Sel dan Penghitungan Sel

Prosedur panen sel dilakukan setelah sel 80% konfluen:

- a. Media kultur (DMEM) dibuang dengan menggunakan mikropipet, lalu sel dicuci dengan PBS steril.
- b. Ditambahkan tripsin 0,25% sebanyak 1 ml untuk melepaskan sel yang bergerombol.
- c. Sel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 3 menit.
- d. DMEM dimasukkan sebanyak 2 ml untuk menginaktifkan tripsin.
- e. Sel diresuspensi dengan pipet sampai semua sel terlepas satu-satu. Sel ditransfer kedalam *conical tube* kemudian DMEM ditambahkan sebanyak 2 ml. sel diresuspensi kembali.
- f. Panenan sel diambil 10 μ l dan dipipetkan ke *hemacytometer*. Sel dihitung dibawah mikroskop *inverted* dengan *counter*. Jumlah sel yang dihitung/ml didapatkan melalui rumus (CCRC,2017):

$$\text{Jumlah sel yang dihitung/ml} = \frac{\Sigma \text{sel pada kamar A+B+C+D}}{4} \times 10$$

- g. Sejumlah sel ditransfer sebanyak yang diperlukan ke dalam *conical tube* dan media lengkap ditambahkan sesuai dengan konsentrasi sel yang dikehendaki.

3.8.3 Prosedur Uji Sitotoksitas MTT assay

- a. Sel dengan konsentrasi $7,5 \times 10^3$ sel/ml didistribusikan sebanyak 1 ml ke dalam masing-masing sumuran *96 microwell plate*.
- b. Sel diinkubasi dengan incubator CO_2 5% pada suhu 37°C selama 24 jam. Inkubasi ini bertujuan agar sel dapat beradaptasi dan menempel pada dinding maupun dasar sumuran.
- c. *Microwell plate* dibagi menjadi 9 bagian:
 - 1) Bagian I: kelompok I berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $150 \mu\text{m/ml}$
 - 2) Bagian II: kelompok II berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $75 \mu\text{m/ml}$
 - 3) Bagian III: kelompok III berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $37,5 \mu\text{m/ml}$
 - 4) Bagian IV: kelompok IV berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $18,75 \mu\text{m/ml}$
 - 5) Bagian V: kelompok V berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $9,375 \mu\text{m/ml}$
 - 6) Bagian VI: kelompok VI berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $4,68 \mu\text{m/ml}$
 - 7) Bagian VII: kelompok VII berisi media kultur, sel osteoblas dengan konsentrasi $2,34 \mu\text{m/ml}$
 - 8) Kelompok kontrol media yang hanya berisi media kultur.
 - 9) Kelompok kontrol sel yang hanya berisi media kultur dan sel tanpa dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam.

- d. Sel diinkubasi selama 24 jam dengan incubator CO₂ 5%, pada suhu 37°C.
- e. Media kultur dibuang dan sel dicuci dengan 100 µl PBS.
- f. Ditambahkan 100 µl media kultur dan 10 µl larutan MTT 5 mg/ml ke dalam setiap sumuran dan diinkubasi kembali selama 4 jam dalam inkubator CO₂ 5%, pada suhu 37°C.
- g. Reaksi MTT dihentikan dengan stopper reagent (SDS 10% dalam 0.1 NHCl), lalu *plate* diletakkan diatas *plateshaker* selama 10 menit agar kristal formazan terlarut.
- h. *Plate* dibungkus dengan *aluminium foil* dan diinkubasi di tempat gelap dengan suhu ruangan selama satu malam. Sel osteoblas yang hidup akan terwarnai dengan formazan menjadi biru tua keunguan sedangkan yang mati tidak terwarna biru tua keunguan.
- i. Hasil berupa pewarnaan sel oleh formazan ini dinyatakan dalam *optical density* (absorbansi) yang dibaca *ELISA reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Pengujian dilakukan dengan triplikasi pada masing-masing senyawa uji, kontrol sel, dan kontrol media (CCRC, 2017).

3.8.4 Pengamatan Hasil

Data yang dihasilkan dari uji sitotoksisitas menggunakan *MTT assay* berupa absorbansi yang kemudian dikonversi ke dalam viabilitas sel. Persentase viabilitas sel dihitung menggunakan persamaan berikut (CCRC, 2017):

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{\text{Absorbansi tes} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi Sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

Keterangan:

% viabilitas sel = persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji

Absorbansi tes = Nilai *Optical Density* (OD) formazan setiap sampel setelah tes.

Absorbansi Media = Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.

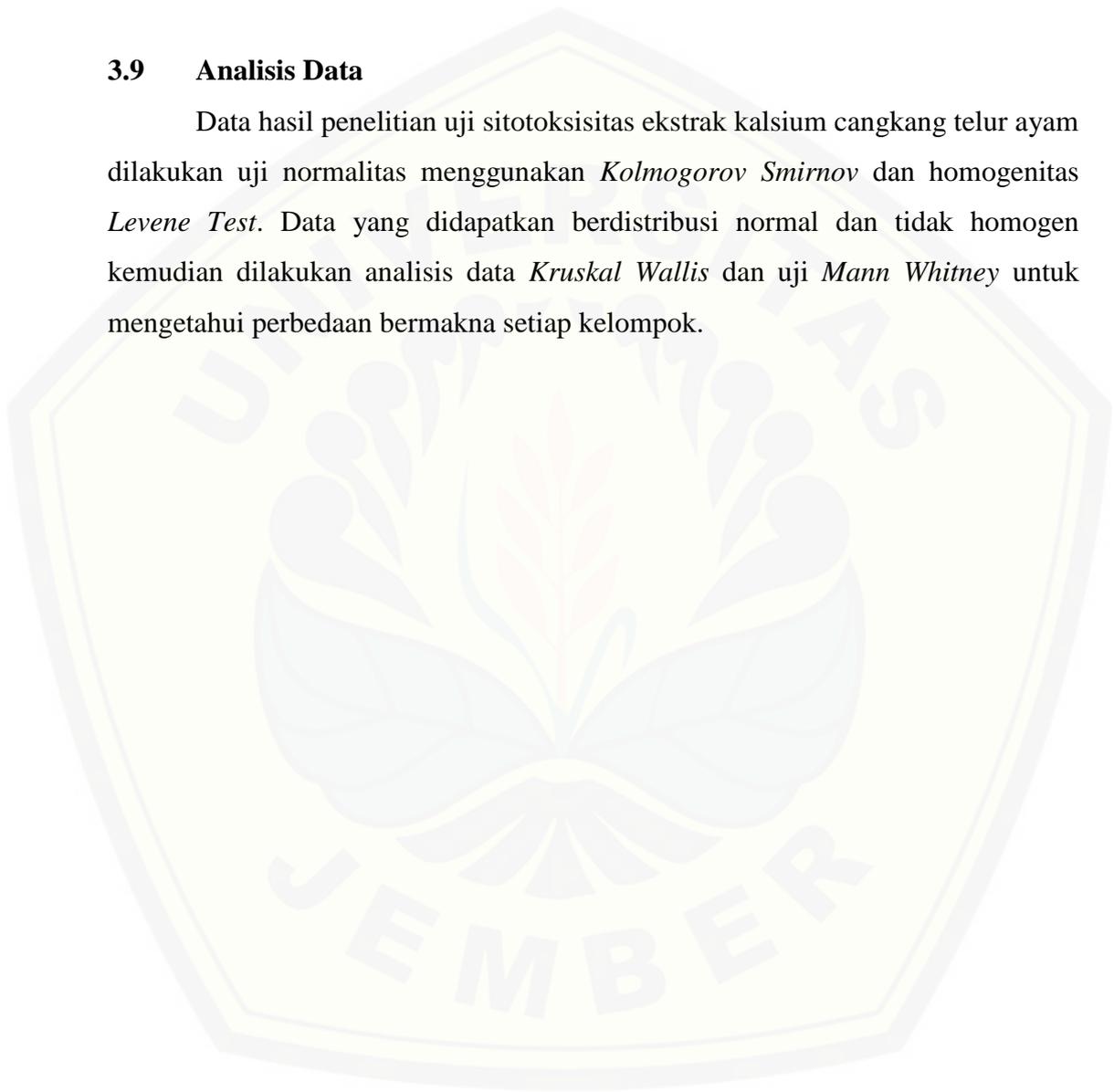
Absorbansi Sel = Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

3.8.5 Perhitungan IC_{50}

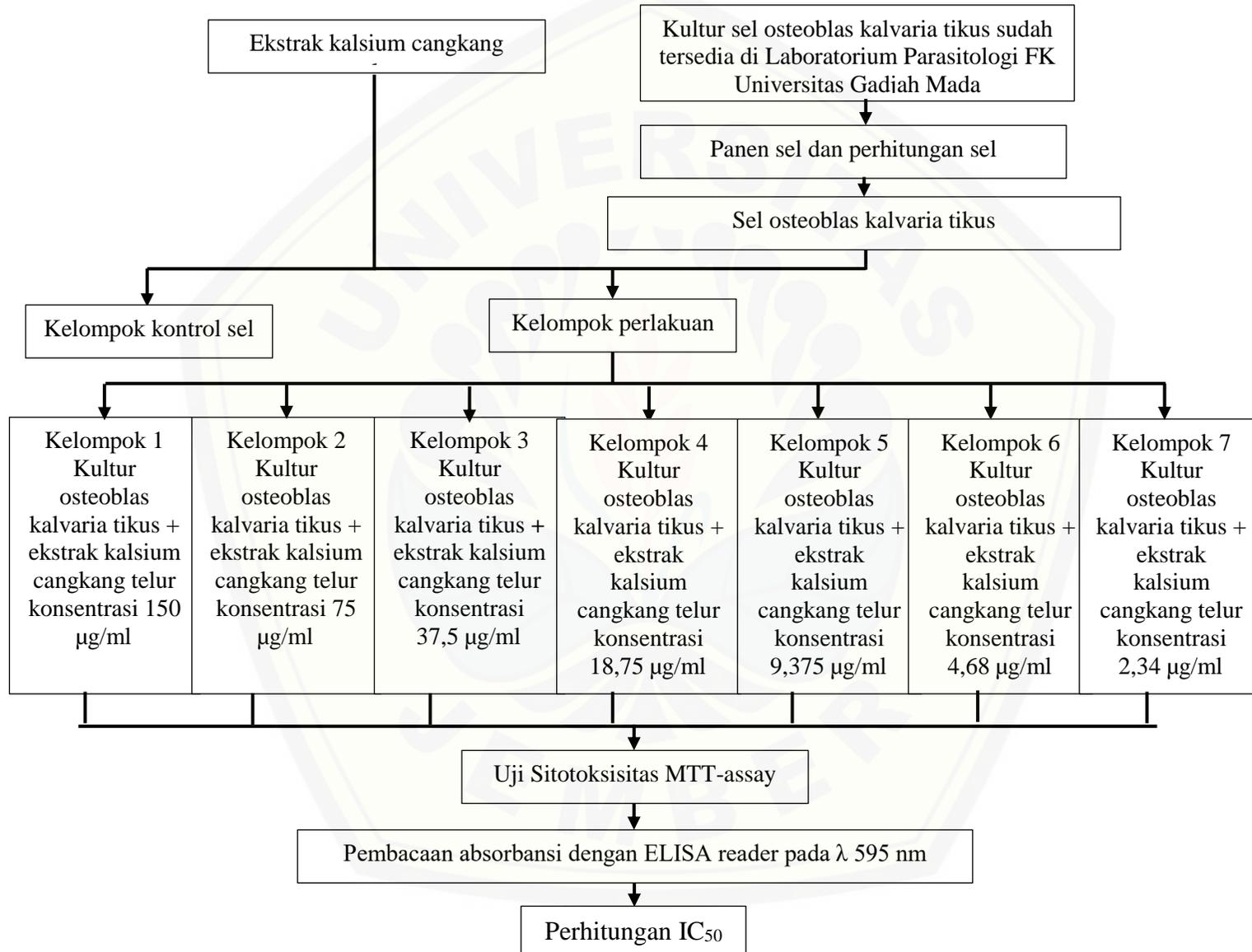
Data yang dihasilkan dari uji sitotoksitas menggunakan MTT *assay* berupa data absorbansi. Kemudian nilai IC_{50} dihitung dengan analisis probit menggunakan SPSS 22.

3.9 Analisis Data

Data hasil penelitian uji sitotoksitas ekstrak kalsium cangkang telur ayam dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov Smirnov* dan homogenitas *Levene Test*. Data yang didapatkan berdistribusi normal dan tidak homogen kemudian dilakukan analisis data *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan bermakna setiap kelompok.



3.10 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Ekstrak kalsium cangkang telur ayam pada konsentrasi 150 µg/ml, 75 µg/ml, 37,5 µg/ml, 18,75 µg/ml, 9,375 µg/ml, 4,68 µg/ml, 2,34 µg/ml tidak toksik terhadap kultur sel osteoblas dengan rentang persentase viabilitas 76,35% hingga 106,99%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kalsium cangkang telur ayam persentase viabilitas sel osteoblas semakin menurun. Konsentrasi optimum ekstrak kalsium cangkang telur ayam adalah 2,34 µg/ml. Nilai IC₅₀ diperoleh konsentrasi penghambatan 50% adalah 298 µg/ml.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut:

1. Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme viabilitas dan respon sel osteoblas yang dipapar ekstrak kalsium cangkang telur ayam dengan menambahkan rentang konsentrasi paparan dan perbedaan waktu
2. Perlu penelitian lebih lanjut meliputi uji biokompabilitas secara *in vivo* atau uji klinis untuk mengetahui efek ekstrak kalsium cangkang telur ayam.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, A. dan M. Ulfah. 2017. Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit dari Tulang Ikan Lamuru (*Sardineella longisepe*)-Kitosan Sebagai Bone Filler. *JF FIK UINAM*. 5(1): 9-15.
- Arabhosseini, A. dan H. Faridi. 2018. Application of eggshell wastes as valuable and utilizable product: a review. *Res. Agr. Eng.* 64:104-114
- Bowo, H.A., 2011. Peran Hidroksiapatit Sebagai Bone Graft Dalam Proses Penyembuhan Tulang. *Stomatognathic*, 8(2):118-121
- Cahaya, Cindy & Lelyati, Sri. (2015). Perkembangan Terkini Membran Guided Tissue Regeneration/Guided Bone Regeneration sebagai Terapi Regenerasi Jaringan Periodontal. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 1. 1. 10.22146/majkedgiind.8810.
- Caldwell G. W., Zhengyin Yan, Wensheng Lang and John A. Masucci. 2012. The IC50 Concept Revisited: *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 12: 1282-1290.
- CCRC, 2017. Standard Operating Procedure, Cancer Chemoprevention Research Cancer Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Cheng, S., Wang, W., Lin, Z., Zhou, P., Zhang, X., Zhang, W., Chen, Q., Kou, D., Ying, X., Shen, Y., Cheng, X., Yu, Z., Peng, L., Lu, C. 2013. *Effects of extracellular calcium on viability and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells in vitro*. *Human Cell*. 26(3):114-120
- Craig, R.G. dan ML. Powers. 2013. *Restorative Dental Materials*, 15th ed. St Louis Missouri: Mosby Company.
- Czekanska, E.M., M.J. Stodart, R.G. Richards, dan J.S. Hayes. 2012. In Search of an Osteoblast Cell Model for In Vitro Research. *European Cells and Materials*. Vol. 24: 1-17.
- Doyle, A., dan Griffiths, J. B. 2000. *Cell and Tissue Culture for Medical Research*. JohnWiley and Sons Ltd. : NewYork.
- Duval, R.E, I. Clareot, F. Dumarcay-Charbonnier, S. Fontanay, A. Marsura. 2012. Interest of Designed Cyclodextrin-tools in Gene Delivert. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 70:360-369.
- Freshney, R.I. 2005. *Cultural of Animal Cell : A manual of basic techniquis*, 5th Ed. New York: Willeyand Sonc Inc.
- Gabusi, E., C. Manferdini, F. Grassi, A. Piacetini, L. Cattini, G. Filardo, E. Lambertini, R. Piva, N. Zini, A. Facchini, dan G. Lisignoli. 2012.

Extracellular Calcium Chronically Induced Human Osteoblast Effects: Specific Modulation of Osteocalcin and Collagen Type XV. *Journal of Cellular Physiology*. 227: 3151-3161.

- Heravi, F., M. Ramezani, M. Poosti, M. Hosseini, A. Shajiei, dan F. Ahrari. 2013. In Vitro Cytotoxicity Assessment of an Orthodontic Composite Containing Titanium-dioxide Nano – Particles. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospect*, 7(4):192-198.
- Herda, A. dan D. Puspitasari. 2016. Tinjauan dan Peran Sifat Material yang Digunakan sebagai Scaffold dalam Rekayasa Jaringan. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 1(5): 56-63.
- Hutomo, D. Setiawan. 2017. Plaster Dibuak dari Cangkang telur ayam yang Bisa Sembuhkan Penyakit Kronis. <http://style.tribunnews.com/2017/02/14/keren-plaster-ini-dibuat-dari-cangkang-telur-yang-bisa-semuhkan-penyakit-kronis>. [Diakses pada 21 Januari 2018].
- Jaso Parson P. A. G. Sitous., 2009. Pemanfaatan Pemberian Tepung Cangkang telur Ayam Ras dalam Ransum Terhadap Performansi Burung Puyuh(*Cortunix-cortunix japonica*) Umur 0-42 Hari., Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Jayakumar, P. dan L. Di Silvio. 2010. Osteoblasts in Bone Tissue Engineering. *Journal of Engineering in Medicine*. 32(2):103-10.
- Jimi, E., S. Hirata, K. Osawa, M. Terashita, C. Kitamura, dan H. Fukushima. 2012. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. *International Journal of Dentistry*. Volume 2012.
- Junqueira, L. C. U. & Mescher, A. L. 2013. *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (Thirteenth edition.). New York: McGraw Hill Medical.
- Khullar S., Mittal A., Datta P. 2012. Healing of Tooth Extraction Socket. *Heal Talk*. 4:37-39.
- Khumairoh, I dan I.M. Puspitasari. 2016. Kultur Sel. *Farmaka*. 4(4): 1-15.
- Kumar, P., Vinitha, B., Fathima G. 2013. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioall Sci*. Vol. 5:125-127.
- Li, M., Fan, L., Jian, X., Yu-Dong, L., Tao, H., Jian-Teng, C. 2016. rhHMGB1 drives osteoblast migration in TLR2/TLR4 and NF- κ B-dependent manner. *Bioscience Report*. 36
- Liu, B., Yanqin L., Yong W., Luna G., Naixiang Z., Jinxiang H. 2019. A Protocol for Isolation and Identification and Comparative Characterization of Primary Osteoblasts from Mouse and Rat Calvaria. *Cell Tissue Bank*. 20:173-182

- Ma'at, Suprpto. 2011. Teknik Dasar Kultur Sel. Surabaya: Airlangga University Press. 22-27.
- Mahreni, Endang Sulistyowati, Saeful Sampe, Wilyam Chandra., 2012. *Pembuatan Hidroksi Apatit Dari Kulit Telur.*, Yogyakarta
- Mohadi, Risfidian & Anggraini, Kiki & Riyanti, Fahma & Lesbani, Aldes. 2016. Preparation Calcium Oxide From Chicken Eggshells. *Sriwijaya Journal of Environment*. 1. 32-35.
- Noviyanti, A.R., R.P. Haryono., D.R. Eddy. 2017. Cangkang Telur Ayam Sebagai Sumber Kalsium dalam Pembuatan Hidroksiapatit untuk Aplikasi Graft Tulang. Bandung. Vol. 5 No. 3: 107-111.
- Nurlaela, A., S.U. Dewi, K. Dahlan, D.S. Soejoko. 2014. Pemanfaatan Limbah Cangkang telur Ayam dan Bebek Sebagai Sumber Kalsium Untuk Sintesis Mineral Tulang. *Jurnal Pendidikan Fisika Indonesia*. 10:81-85.
- Safriani, K. 2014. Perbedaan Lamanya Penyembuhan Pasca Pencabutan Gigi Antara Perokok dan Bukan Perokok. Universitas Hassanudin. Makassar.
- Sebaugh J.L., 2011. Guidelines for accurate EC50/IC50 Estimation. *Pharmaceutical Statistics*. 10(2): 128-134.
- Siregar, F. dan B. Hadijono. 2000. Uji Sitotoksitas dengan MTT Esei. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 7:29-30.
- Swarjana, I. K. 2012. *Metode Penelitian Kesehatan*. Edisi Satu. Yogyakarta: Penerbit ANDI
- Vajrabhaya, La-ongthong, K. Suwana, S. Rudee. 2017. Cytotoxic and the proliferative effect of cuttlefish bone on MC3T3-E1 osteoblas cell line. *European Journal of Dentistry* 11:503-507.
- Van der Weijden F, Dell'Acqua F, Slot DE. 2009. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans :a systematic review. *J Clin Periodontol*. 36: 1048–1058.
- Wang, M.O., M.E. Julie, A.T. Joshua. 2013. Evaluation of the In Vitro Cytotoxicity of Cross-Linked Biomaterials. *American Chemical Society Publications* 14:1321-1329.
- Y. Y. Khrunyka,c *, I. V. Vyalykhb , A. V. Korelina , S. V. Belikova , M. S. Karabanalova , S. B. Rakitinc , R. V. Kamalova, and A. A. Popova. 2017. *Isolation of Primary Osteoblast Cell Lines from Adult Rat and Rat Embryos and Their Use as Models for in Vitro Biocompatibility Tests of Nanostructured Titanium-Based Implants*. *Doklady Biological Sciences*. 475(1): 175-179

LAMPIRAN

Lampiran A. Ethical Clearance

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

ETHIC COMMITTEE APPROVAL
No. 216/UM25.8/KEPK/04/2018

Title of research protocol	"Cytotoxicity Test of Eggshell Calcium Extract Against Ovary Culture Cell of Gadoblast"
Document approved	Research Protocol
Principal investigator	I Pita Swastikawan Ari Kusumadewa
Member of research	-
Responsible Physician	I Pita Swastikawan Ari Kusumadewa
Date of approval	November 09 th , 2018
Place of research	Laboratory of Parasitology Faculty of Medicine UGM

The Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, November 27th, 2018

Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember	Chair of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember
---	--


Prasetyo A. M. Wic, Sp. (R)


David Ayu Ratna Dewanti, M.S

Lampiran B. Data Absorbansi dan Viabilitas Sel Osteoblas Setelah Dipapar Ekstrak Kalsium Cangkang telur ayam

B.1 Data Absorbansi Sel Osteoblas

Konsentrasi	Absorbansi			\bar{X}
	1	2	3	
150 $\mu\text{g/ml}$	0.293	0.289	0.293	
75 $\mu\text{g/ml}$	0.313	0.325	0.32	
37,5 $\mu\text{g/ml}$	0.316	0.362	0.312	
18,75 $\mu\text{g/ml}$	0.343	0.326	0.329	
9,375 $\mu\text{g/ml}$	0.34	0.364	0.335	
4,68 $\mu\text{g/ml}$	0.364	0.342	0.366	
2,34 $\mu\text{g/ml}$	0.387	0.357	0.385	
Media	0.082	0.078	0.082	0.080667
Media + Sel	0.347	0.359	0.365	0.357

$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{\text{Absorbansi tes} - \text{Absorbansi media}}{\text{Absorbansi Sel} - \text{Absorbansi media}} \times 100\%$$

Keterangan:

% viabilitas sel = persentase jumlah kehidupan sel setelah di uji

Absorbansi tes = Nilai Optical Density (OD) formazan setiap sampel setelah tes.

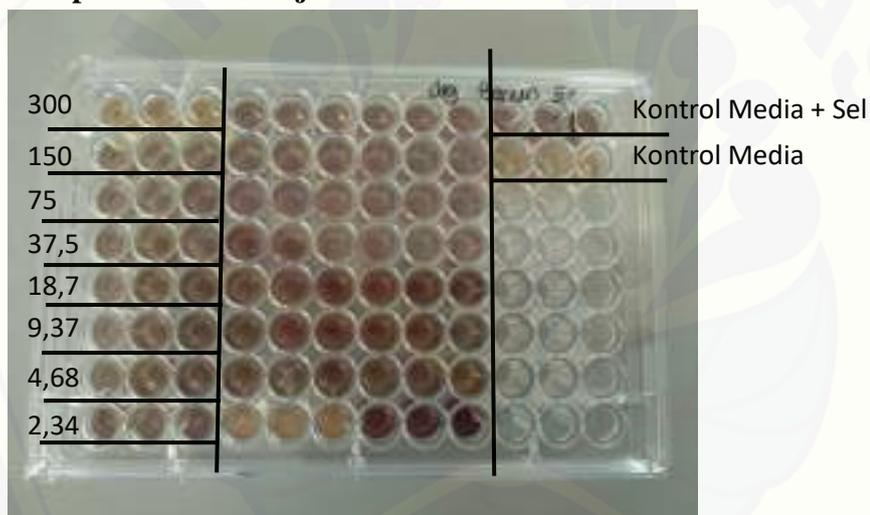
Absorbansi Media = Nilai OD formazan pada rata-rata setiap kontrol media.

Absorbansi Sel = Nilai OD formazan pada rata-rata kontrol sel.

B.2 Data Penghitungan Viabilitas Sel Osteoblas

Konsentrasi	Viabilitas %		
	1	2	3
150 µg/ml	76.84	75.39	76.84
75 µg/ml	84.08	88.42	86.61
37,5 µg/ml	85.16	101.8	83.71
18,75 µg/ml	94.93	88.78	89.86
9,375 µg/ml	93.48	102.53	92.03
4,68 µg/ml	102.53	94.57	103.25
2,34 µg/ml	110.85	100	110.13

Lampiran C. Hasil Uji MTT



Lampiran D. Perhitungan IC₅₀

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT .010	551.423		
.020	544.874		
.030	540.425		
.040	533.739		
.050	498.830		
.060	476.682		
.070	460.021		
.080	446.468		
.090	434.932		
.100	424.818		
.150	415.762		
.200	407.526		
.250	399.944		
.300	368.555		
.350	343.608		
.400	322.205		
.450	302.985		
.500	298.337		
.550	219.739		
.600	203.388		
.650	186.488		
.700	168.678		
.750	149.458		
.800	128.055		
.850	103.108		
.900	71.719		
.910	64.137		
.920	55.901		
.930	46.845		
.940	36.730		
.950	25.195		
.960	11.642		
.970	-5.019		

.980	-27.167		
.990	-62.076		

Lampiran E. Uji Statistik

E.1 Hasil Uji Normalitas *Kolmogorov-Smirnov*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		standardized Residual
N		7
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.0000000
	Std. Deviation	4.22412895
Most Extreme Differences	Absolute	.197
	Positive	.197
	Negative	-.111
Test Statistic		.197
Asymp. Sig. (2-tailed)		.200 ^{c,d}

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

c. Lilliefors Significance Correction.

d. This is a lower bound of the true significance.

E.2 Hasil Uji Homogenitas *Levene-Test*

Test of Homogeneity of Variances			
Viabilitas			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.526	6	14	.009

E.3 Hasil Uji *Kruskal Wallis*

Test Statistics ^{a,b}	
Viabilitas	
Chi-Square	15.644
df	6
Asymp. Sig.	.016

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Konsentrasi

E.4 Hasil Uji *Mann Whitney U*

($\mu\text{g/ml}$)	150	75	37,5	18,75	9,375	4,68	2,34
150	-	0,046*	0,046*	0,046*	0,046*	0,046*	0,046*
75	0,046*	-	0,827	0,050*	0,050*	0,050*	0,050*
37,5	0,046*	0,827	-	0,513	0,275	0,127	0,127
18,75	0,046*	0,050*	0,513	-	0,275	0,127	0,050*
9,375	0,046*	0,050*	0,275	0,275	-	0,184	0,127
4,68	0,046*	0,050*	0,127	0,127	0,184	-	0,275
2,34	0,046*	0,050*	0,127	0,050*	0,127	0,275	-

* : Signifikan ($p < 0,05$)

Lampiran F. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan	Keterangan	Alat dan bahan	Keterangan
	Timbangan		Tabung reaksi

	<p>Gelas kimia</p>		<p><i>Conical tube</i></p>
	<p>Pipet tetes</p>		<p>Mikropipet</p>
	<p>Tabung eppendorf</p>		<p>Mikroskop <i>inverted</i></p>
	<p><i>Blue tip dan yellow tip</i></p>		<p>Inkubator CO₂ suhu 37°C</p>
	<p><i>Handscoon dan masker</i></p>		<p>Botol duran</p>

			
	<p>96 <i>microwell</i> <i>plate</i></p>		
	<p>Trypsin</p>		<p><i>Dulbecco</i> <i>Minimal</i> <i>Essentials</i> <i>Medium</i> (DMEM)</p>