

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (true experimental design) di laboratorium secara in vitro. Produksi antibodi poliklonal telomerase dilakukan pada kelinci jantan albino usia 12-16 minggu. Adanya peningkatan kadar telomerase diukur dengan metode ELISA.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah 2 kelinci albino jantan. Sampel dari penelitian ini adalah pengambilan darah kelinci setelah diinduksi *Human Telomerase Peptide*.

4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kadar antibody telomerase pada kelinci albino jantan. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah peningkatan titer antibody telomerase setelah dilakukan booster.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari- Juli 2013 di Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium Fisiologi FKUB, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati IPTEK, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya.

4.5 Alat dan Bahan

1. Perawatan kelinci

Kelinci jantan albino 2 buah, kandang 80 cm x 40 cm x 30 cm 2 buah, terbuat dari kayu, botol air dan tempat makan masing-masing 2 buah, pakan 3 karung, anti-gudig oles.

2. Produksi Antibodi Telomerase

Human Telomerase peptide 100µl, 20 ml Tris-Cl pH 6,8, PBS (Phosphate Buffer Saline) 100ml, Vacutainer Heparin 4 ml, disposable spuit 3 ml, Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1ml, Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1 ml.

3. Purifikasi Antibodi Telomerase

Centrifuge tube 1.5 ml, blue tips, Sentrifuge dingin-Low RPM (Hettich), Membran dialisis 25mlx1, Natrium Karbonat, Amonium sulfat (Merk), EDTA, Natrium Klorida, Di-kalium Hidrogen Fosfat, Di-natrium Hidrogen Fosfat, Selovan, , Aquadest steril, Handscone.

4.6 Definisi Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan sebagai produsen antibodi dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan berusia 12-16 minggu yang dibeli dari Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Human Telomerase Peptide: Antigen berupa enzim telomerase sel kanker pada tikus yang digunakan untuk menginduksi terbentuknya antibodi telomerase pada kelinci yang dibeli dari US BIO
- Complete Freund Adjuvant (CFA) dan Incomplete Freund Adjuvant (IFA). CFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian antigen pertama, sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian (booster) kedua. CFA dan IFA didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Antibodi Telomerase: antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi ke dalam tubuh kelinci. Pengecekan kadar antibodi yang terbentuk dengan metode ELISA.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Produksi Antibodi Telomerase

Protein *Human Telomerase Peptide* diinjeksikan pada dua ekor kelinci jantan berusia 12-16 minggu secara subkutan. Sebelum penginjeksian, antigen telomerase diemulsikan ke dalam Complete Freund Adjuvant (CFA) untuk penginjeksian awal. Booster pertama dan kedua dilaksanakan pada minggu ke-2 dan ke-8 dengan menggunakan antigen yang sama, melalui pengemulsian ke dalam Incomplete Freud Adjuvant. Tujuan booster adalah untuk menginduksi respon imun sekunder yang akan meningkatkan respon antibodi terhadap telomerase pasca

injeksi awal. Sebagai darah kontrol, sampel darah kelinci juga diambil sebelum antigen diinjeksikan. Setelah booster pertama pada minggu ke-2, maka dilakukan pengambilan darah setiap minggunya secara berturut-turut sejak minggu ke-3 hingga minggu ke-7. Demikian pula pengambilan darah berikutnya dilakukan sejak minggu ke-9 hingga minggu ke-13 pasca booster kedua (dilakukan pada minggu ke-8). Serum darah dikumpulkan untuk dimurnikan.

4.7.2 Purifikasi Antibodi

Darah yang telah terkumpul disentrifus pada kecepatan 3500 rpm (15 menit) untuk mendapatkan serumnya. Serum yang terkumpul akan dipurifikasi/dimurnikan menggunakan metode SAS (Saturated Ammonium Sulfate), untuk mendapatkan konsentrat IgG poliklonal terhadap antigen human telomerase peptide.

4.1.3 Penentuan Kadar Telomerase Pada Sampel melalui ELISA

Metode ELISA digunakan untuk mengukur kadar antibodi telomerase pada kelinci albino jantan yang diinduksi *Human Telomerase Peptide*. Pada supernatan hasil ekstraksi sampel, dilakukan pengenceran dengan assay buffer (1:10). Hasilnya diinkubasikan dalam microplate overnight, 4°C. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Tambahkan 50µL blocking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 µl antibodi primer (antibodi telomerase) dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1:250 selama 2 jam. Suspensi diambil dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 3 kali @5 menit, dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder dalam Tris Buffer Saline dengan perbandingan 1:1000 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween selama 2 kali @5 menit. Tambahkan 50µL antibodi sekunder berlabel AP (Alkaline Phosphatase) dan inkubasi 30 menit. Cuci dengan PBS-Tween selama 2 kali @5 menit. Substrat BCIP/NBT dimasukkan dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan NAOH 3M selama 15 menit. Hasil dibaca pada ELISA reader dengan λ 405 nm.

4.8 Analisa Data

Pengambilan data kadar antibodi telomerase diperoleh melalui pengukuran ELISA.

