

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vitro* menggunakan rancangan *Randomized Group Post Test Only Design*.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah sel kanker leher rahim dari kultur sel *HeLa*. Perhitungan besarnya pengulangan pemeriksaan pada kultur (Hanafiah, 2005):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

t: jumlah perlakuan, r: jumlah ulangan

Pada penelitian ini  $t = 4$  sehingga jumlah pengulangan adalah:

$$(4-1)(r-1) \geq 15$$

$$r-1 \geq 15:3$$

$$r = 5 + 1 = 6$$

#### 4.3 Variabel Penelitian

Desain penelitiannya adalah sebagai berikut:

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *siRNA E6* yang dibagi dalam kelompok:

- a. Kelompok 1: kelompok kontrol yaitu kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) tanpa terpapar *siRNA E6*
  - b. Kelompok 2: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar *siRNA E6* konsentrasi 0,5 µg
  - c. Kelompok 3: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar *siRNA E6* konsentrasi 1 µg
  - d. Kelompok 4: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar *siRNA E6* konsentrasi 2 µg
- Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya cahaya yang diserap oleh protein metabolit hasil pernapasan sel *HeLa* yang hidup setelah perlakuan dengan *siRNA E6* melalui *MTT assay*.

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biomedik FKUB. Waktu penelitian dilaksanakan mulai sekitar bulan Februari sampai dengan Mei 2015.

#### 4.5 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

1. *siRNA E6*

Produk *siRNA E6* didapatkan dari perusahaan Neo Biolab.

2. Subkultur sel *HeLa*

*Trypsin-EDTA*, sentrifugator, medium kultur *LPM*, inkubator 37°C, *plate 24-well*, mikropipet, ujung pipet steril, *falcon 15 ml*.

3. *Duplicate (24-well) transfections*

*Lipofectamine™2000*, kompleks *DNA-lipid*, *plate 24-well*, mikropipet.

#### 4. Resuspensi dasar *siRNA E6* dan pembuatan medium

*siRNA E6*, *seal tube*, *DNA/RNA-ase free water*, pipet, *orbital mixer/shaker*, 0,48 *HEPES*, 0,4 Natrium bikarbonat, *LPM* 200 ml, *plate 24-well*, mikropipet.

#### 5. Transfeksi

*DNA*, *serum-free LPM*, *falcon* 4 ml, medium kultur, *siRNA E6*, *Lipofectamine<sup>TM</sup>2000*, *siRNA buffer*, inkubator.

#### 6. Perlakuan *siRNA E6* pada subkultur sel *HeLa*

*siRNA E6*, *DNA/RNa-ase free water*, *serum-free LPM*, pipet, inkubator, medium kultur, *plate 24-well*, *Lipofectamine<sup>TM</sup>2000*, *PBS* pH 7,4, 0,48 *HEPES*, 0,4 Natrium bikarbonat, mikropipet, mikroskop.

#### 7. *MTT* Assay

Reagen *MTT*, reagen detergen, *microtiter plate reader* dengan filter 650 nm dan 570 nm, *inverted microscope*, pipet *multi-channel*, inkubator 37°C, *Laminar Flow Hood*, *microtiter plate (flat-bottomed)*, *falcon* 4ml, pipet serologis, ujung pipet steril, *ELISA Reader*.

### 4.6 Definisi Istilah/Operasional

- Hewan coba: hewan coba yang digunakan sebagai produsen antibodi dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan berusia 12-16 minggu. Kelinci digunakan untuk memproduksi antibodi telomerase karena kelinci paling umum digunakan dalam produksi antibodi poliklonal, di samping lebih murah, serta mudah perawatannya. Secara umum, apabila hubungan filogenetik semakin jauh, maka potensi titer antibodi semakin tinggi.

- Antibodi telomerase: antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi ke dalam tubuh kelinci. Pengecekan kadar antibodi yang terbentuk dengan metode *ELISA* dan *Western Blot*.
- *siRNA E6*: molekul *RNA* yang mempunyai kemampuan dalam menekan ekspresi dari *mRNA E6*, sehingga menurunkan sintesis protein *E6* di dalam sel kanker leher rahim.
- *Lipofectamine<sup>TM</sup>2000*: merupakan reagen penghantar *siRNA E6* ke dalam sel *HeLa*.
- *HeLa cell line*: merupakan sel kanker serviks manusia yang telah dimurnikan dan didiferensiasikan sehingga menjadi *cell line* yang murni.

#### 4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

Pengambilan data dilakukan setelah perlakuan mencapai minggu ke-12. Data diambil dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya untuk mengetahui jumlah sel *HeLa* yang masih hidup pasca perlakuan melalui pengukuran absorbansinya pada kalorimetri.

1. Subkultur sel *HeLa*
  - a. Sel *HeLa* dipanen dengan *Trypsin-EDTA*.
  - b. Sel *HeLa* disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 8 menit.
  - c. Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan medium kultur (*LPM*) yang sudah ditambahkan serum.
  - d. Sel disubkultur pada *plate 24-well* dan diinkubasi dalam inkubator 37°C, 95% udara, 5% CO<sub>2</sub>, 100% kelembapan.
2. *Duplicate (24-well) transfections*

- a. Melakukan subkultur sel sampai *confluent* 70%-90% pada saat transfeksi (*24-well*:  $0,5 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^5 = 1 \cdot 10^5$ ).
- b. Melakukan dilusi dengan 2,5  $\mu\text{L}$  *Lipofectamine*<sup>TM</sup>2000 ditambah dengan 5  $\mu\text{g}$  *DNA*.
- c. Menambahkan dilusi 50  $\mu\text{L}$  *DNA* ke dilusi 50  $\mu\text{L}$  *Lipofectamine*<sup>TM</sup>2000 (rasio 1 : 1) kemudian inkubasi.
- d. Menambahkan kompleks *DNA-lipid* ke dalam sel (konsentrasi akhir *Lipofectamine*<sup>TM</sup>2000/*well* = 2,5  $\mu\text{L}$ ) kemudian sel diinkubasi selama 1-3 hari dilanjutkan dengan analisis (*DNA/well* = 500 ng).

**Tabel 4.7.1 Rekomendasi Volum Per Well Untuk Transfeksi siRNA pada konsentrasi akhir 25 nM**

Plating Format (wells/plate)	Surface Area (cm <sup>2</sup> /well)	Tube 1: diluted siRNA ( $\mu\text{L}$ /well)		Tube 2: diluted DharmaFECT ( $\mu\text{L}$ /well)		Complete Medium ( $\mu\text{L}$ /well)	Total Transfection Volume ( $\mu\text{L}$ /well)
		Volume of 5 $\mu\text{M}$ siRNA ( $\mu\text{L}$ )	Serum-free Medium ( $\mu\text{L}$ )	Volume of DharmaFECT reagent ( $\mu\text{L}$ )*	Serum-free Medium ( $\mu\text{L}$ )		
96	0.3	0.5	9.5	0.05-0.5	9.95-9.5	80	100
24	2	2.5	47.5	0.25-2.5	49.75-47.5	400	500
12	4	5	95	0.5-5.0	99.5-95.0	800	1000
6	10	10	190	1.0-10.0	199.0-190.0	1600	2000

Volume per *well* DharmaFECT menggambarkan petunjuk dan membutuhkan optimisasi. Konsentrasi akhir pada 0,05-5  $\mu\text{L}$  DharmaFECT/100  $\mu\text{L}$  medium transfeksi. Catatan: 25 nM = 25 nmol/L - 25 pmol/mL = 25 fmol/ $\mu\text{L}$ .

### 3. Resuspensi Dasar siRNA E6 dan pembuatan medium

- a. Melakukan sentrifugasi tabung kecil yang mengandung siRNA E6 untuk meyakinkan bahwa butiran siRNA terkumpul di dasar tabung kecil.
- b. Meresuspensikan 1 mL *DNA/RNA-ase free water* dengan siRNA E6.

- c. Menyampurkan larutan tersebut menggunakan pipet dengan diberi gaya dorong ke atas dan ke bawah sebanyak 3-5 kali, hindari terbentuknya gelembung udara dan tutup tabung dengan hati-hati.
- d. Meletakkan tabung yang berisi larutan ke dalam *orbital mixer/shaker* selama 30 menit pada suhu ruang.
- e. Melakukan sentrifugasi tabung yang mengandung *siRNA E6* untuk meyakinkan bahwa larutan terkumpul pada dasar tabung.
- f. Mencampurkan 0,48 *HEPES* dengan 0,4 Natrium bikarbonat dan *LPM* 200 ml untuk membuat medium kultur *siRNA E6*.

#### 4. Transfeksi

- a. Membuat *serum-free medium*.
- b. Mencampurkan *siRNA E6* yang sudah diencerkan sebelumnya dengan medium *serum-free LPM* dan *Lipofectamine<sup>TM</sup>2000* dalam *falcon* 4 ml menggunakan mikropipet.
- c. Menunggu selama 5 menit, mencuci sel *HeLa* menggunakan *buffer*, kemudian diinkubasi.
- d. Mencampurkan kompleks *DNA-lipid* dengan sel *HeLa* hingga mencapai konsentrasi 5  $\mu$ L *siRNA E6* dalam 4 ml *serum-free medium*.
- e. Melakukan inkubasi selama 2 x 24 jam.

#### 5. Perlakuan *siRNA E6* pada subkultur sel *HeLa*

- a. Kontrol x 6 @500 mL = 3 M = 1 mL.
- b. 1  $\mu$ g *siRNA E6* x 6 pengulangan.

- c. Stok *siRNA E6* diencerkan dalam *DNA/RNA-ase free water* menjadi 1,5 mg *siRNA E6* = konsentrasi 1,5 mg/mL.

#### 6. *MTT Assay*

- a. Menanam sel pada *plate 24-well*.
- b. Melakukan inkubasi selama 6-24 jam.
- c. Menambahkan 10  $\mu\text{L}$  reagen *MTT*.
- d. Melakukan inkubasi selama 2-4 jam sampai presipitat berwarna ungu terlihat.
- e. Menambahkan 100  $\mu\text{L}$  reagen Detergen.
- f. Mendinginkan pada suhu ruangan dalam kondisi gelap selama 2 jam.
- g. Merekam absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm.

#### 4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan uji normalitas untuk mengetahui persebaran data normal atau tidak dan uji varian untuk menentukan varian data sama atau tidak. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *One-Way Anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*.

Selanjutnya, untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post-Hoc Tukey HSD* sebagai lanjutan *One-Way Anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis*. Uji korelasi dilakukan dengan metode *Spearman*. Penelitian ini dinilai bermakna bila  $p < 0,05$ . Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS (Andika, 2009).