

## BAB IV

### 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 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah siRNA E6 yang dipaparkan pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell line*) dengan 4 konsentrasi siRNA E6 yaitu: 0 µg sebagai kontrol, 0,5µg, 1 µg, dan 2 µg sebagai kelompok perlakuan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya ikatan antigen antibodi E6 pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell line*) setelah perlakuan dengan siRNA E6. Pendeteksian jumlah antigen antibodi akan dilakukan menggunakan metode *Immunositokimia*.

#### 4.3 Objek dan Sampel

Sampel penelitian adalah sel kanker leher rahim dari kultur *HeLa cell line*, perhitungan besarnya pengulangan pemeriksaan pada kultur adalah sebesar 6 kali pengulangan (Hanafiah, 2005).

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya selama 4 bulan.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. siRNA E6: molekul RNA yang mempunyai kemampuan dalam menghentikan ekspresi dari mRNA E6, sehingga tidak akan terbentuk protein E6 di dalam sel kanker leher rahim.
2. Hewan coba: hewan coba yang digunakan sebagai produsen antibody dalam penelitian ini adalah kelinci albino jantan berusia 12-16 minggu.
3. *Telomerase human peptide*: Antigen berupa protein telomerase sel kanker pada manusia yang digunakan untuk menginduksi terbentuknya antibody telomerase pada kelinci.
4. Complete Freund's Adjuvant (CFA) dan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvant pada penginjeksian antigen pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvant pada penginjeksian (*booster*) selanjutnya.
5. Antibodi telomerase: antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi kedalam tubuh kelinci.
6. HeLa *cell line*: merupakan sel kanker leher rahim manusia yang telah dimurnikan dan didiferensiasikan sehingga menjadi *cell line* yang murni.

7. Lipofectamine TM 2000: merupakan reagen penghantar siRNA E6 kedalam sel HeLa.

#### 4.6 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk memproduksi siRNA E6 yang akan dideteksi menggunakan metode *Immunositokimia*. Alur penelitiannya adalah sebagai berikut:

1. Sintesis siRNA E6

siRNA disintesis dengan menghasilkan rantai *double strand* RNA yang merupakan suatu *complementary* nukleotida mRNA tertentu. Untuk menghasilkan siRNA, dilakukan pengambilan data protein E6 pada situs NCBI. Protein E6 yang didapatkan dari situs NCBI, selanjutnya dilakukan pengambilan FASTA yang merupakan susunan asam nukleat E6. Sintesa dilakukan menggunakan perusahaan pembuat siRNA yaitu dharmacon. Rantai asam nukleat dari protein E6 digunakan dalam menghasilkan *complementary* siRNA yang spesifik terhadap protein E6.

2. Produksi Antibodi Telomerase

Antibodi Telomerase dihasilkan dengan cara meninjeksikan antigen protein telomerase ke dalam tubuh kelinci jantan berusia 14-16 minggu secara intra muscular. Respon imunitas tubuh kelinci terhadap antigen yang disuntikan akan merangsang pembentukan antibodi igG pada tubuh kelinci. 200  $\mu$ L protein telomerase yang telah disediakan selanjutnya diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl lalu diemusikan dengan *Freud adjuvant* dengan konsen-

trasi 1:1 dan diinjeksikan secara intramuscular pada tubuh kelinci pada minggu pertama, ketiga, dan minggu kelima pasca perlakuan. Antibodi yang dihasilkan pada tubuh kelinci dipanen melalui darah pada *vena auricularis* menggunakan spuit 3cc dan *vacutainer heparin* untuk dilakukan pengumpulan serum darah kelinci. Pengambilan darah dilakukan pada minggu sebelum perlakuan sebagai kontrol, minggu pertama hingga minggu kesepuluh pada setiap minggunya. Serum yang terkumpul dianalisis menggunakan *Western blotting* dan ELISA (Florida State University, 2007):

- a) Dua ratus mikro liter masing-masing protein *E6 dan E7 mouse peptide* yang telah diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl diemulsikan dengan *Freund's complete adjuvant* (CFA) (Sigma) dalam jumlah yang sama dan diinokulasikan secara intramuskuler (IM) pada 2 kelinci jantan(4 bulan).
- b) Dua minggu setelah penginjeksian awal, dilakukan booster pertama menggunakan dua ratus mikro liter dari masing-masing protein *E6 dan E7 mouse peptide* yang telah diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl, diemulsikan dengan *Freund's incomplete adjuvant*(IFA) (Sigma) dalam jumlah yang sama dan diinokulasikan secara intramuskuler (IM).
- c) Satu minggu setelah booster pertama, pengambilan darah (panen) dapat dilakukan. Panen dilakukan hingga minggu kelima setelah booster 1, setelah itu dilakukan booster 2. Setelah imunisasi terakhir, sampel darah diambil dari kelinci dan produksi antibody diidentifikasi melalui *Western Blot*.

### 3. Purifikasi dan Pendeteksian Antibodi Telomerase

Purifikasi dilakukan pada serum yang dikumpulkan untuk menghasilkan igG murni, purifikasi menggunakan metode SAS 50 (*saturated ammonium sulfate* 50). Setelah didapatkan konsentrat antibodi igG poliklonal selanjutnya dilakukan Western blotting untuk melihat ikatan antibody secara kualitatif dengan metode (Abcam, 2010): *Running* antigen pada SDS PAGE lalu transfer protein pada kertas nitro selulosa. Untuk memastikan antigen telah tertransfer pada nitro selulosa, rendam kertas nitro selulosa pada poncau 1% dan bilas dengan skim milk 5% lalu cuci dengan TBS *tween* 0,05%. Lanjutkan dengan inkubasi menggunakan biotin sebagai antibody sekunder, lalu inkubasikan menggunakan substrat TMB. Adanya pita menunjukkan terbentuknya ikatan spesifik antigen-antibodi E6. *Indirect* ELISA (*Enzyme Link Immuno Sorbent Assay*) digunakan untuk melihat immunogenitas dari protein telomerase. Secara detail, metodenya: serum kelinci yang terkumpul diencerkan dengan *Assay buffer* dengan perbandingan 1:10. Hasil kemudian diinkubasikan semalam dalam suhu 40C pada *microplate* ELISA, lalu cuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Tambahkan 50µL *blocking buffer*. Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100µl antibodi primer (anti-E6) dilanjutkan dengan inkubasi antibody sekunder dalam *Tris Buffer Saline* 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Biotin digunakan sebagai antibody sekunder, lalu TMB digunakan sebagai substrat. Hasil yang didapatkan dibaca pada ELISA reader dengan  $\lambda$  405 nm.

#### 4. Kultur Sel HeLa

Sel HeLa dipanen dengan Tripsin-EDTA, lalu disentrifugasi selama 8 menit pada 1500 rpm, pelet yang didapatkan dikultur pada MEM yang sudah ditambahkan serum. Sel ditanam pada well dan diinkubasi 37°C, 95% udara, 5% CO<sub>2</sub>, 100% kelembapan.

#### 5. Perlakuan siRNA E6 pada Kultur HeLa melalui immunositokimia

Untuk menkonjugasikan siRNA E6 agar dapat menembus inti sel HeLa, reagen Lipofectamine™ 2000 digunakan pada penelitian ini. Penggunaan Lipofectamine™ 2000 menggunakan protocol resmi Lipofectamine™ 2000. Setelah siRNA E6 terkonjugasi dalam Lipofectamine™ 2000, kompleks ini memiliki kemampuan dalam menembus membrane sel dan mencapai mRNA E6 yang spesifik. Pengaruh penurunan ekspresi dari protein E6 pada protein telomerase dapat diamati menggunakan antibodi telomerase denganteknik Imunositokimia dengan cara :

- a. Slide preparat jaringan particular dicuci PBS pH 7,4 (5 menit).
- b. Ditetesi dengan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 20 menit.
- c. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- d. *Blocking* dengan 5% FBS yang mengandung 0.25% teilon x-100 (1 jam).
- e. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- f. Inkubasikan preparat dengan antibodi primer selama semalam (4°C), lalu cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- g. Diinkubasi menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit* (biotin) selama 1 jam pada suhu ruang.

- h. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- i. Ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*), inkubasi 40 menit.
- j. Dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- k. Ditetesi dengan DAB (*Diamano Benzidin*) dan diinkubasi 10 menit, lalu dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit tiga kali.
- l. Ditetesi dengan *Mayer Hematoxylin* sebagai *Counterstain* (10 menit). Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikering anginkan. Lalu preparat *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan cover glass. Preparat positif apabila terdapat warna coklat pada preparat.

#### 4.7 Prosedur Pengumpulan dan Analisis 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. 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* 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).