

## 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*. Desain penelitiannya adalah sebagai berikut:

### 4.2 Variabel Penelitian

- Variabel bebas dalam penelitian ini adalah antibodi telomerase yang dibagi dalam kelompok:
  1. Kelompok 1: kelompok kontrol yaitu kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) tanpa terpapar antibodi telomerase
  2. Kelompok 2: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar antibodi telomerase konsentrasi 0,5  $\mu\text{g}$
  3. Kelompok 3: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar antibodi telomerase konsentrasi 1  $\mu\text{g}$
  4. Kelompok 4: kultur sel kanker leher rahim (*HeLa cell line*) terpapar antibodi telomerase konsentrasi 2  $\mu\text{g}$
- Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah banyaknya ikatan antigen-antibodi telomerase pada sel HeLa setelah perlakuan dan pengecatan dengan imunositokimia

### 4.3 Populasi dan Sampel

Sampel penelitian adalah sel kanker leher rahim dari kultur sel *HeLa cell*. 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:

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

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

$$r = 5 + 1 = 6$$

#### 4.4 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUB, Laboratorium Fisiologi FKUB, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan pada tahun 2012.

#### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

##### 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

*Telomerase mouse peptide* 100 $\mu$ l, 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. Pendeteksian Antibodi Telomerase

Elektroforesis, Acrlamida 30% (50ml), Pembuatan Gel, SDS 10%, APS 10%, Protein marker, Yellow tips, Blue tips, Semi Dry Trans Blot, Elektroforesis Vertical App, Western Blotting, Tris HCL pH 8,8 (50 ml), Skim milk, Tween 20, Tris-base, Membran Nitrocellulose, Ponceau (100ml)/WB, IgG anti rabbit, SA-HRP, TMB



Membrane, Sentrifuge RT, ELISA Plate, BSA, TMB microwell peroksidase, ELISA Reader, PBS steril.

5. Kultur sel HeLa

Trypsin-EDTA, MEM Sigma, PBS, Deionized water, Fetal Bovine Serum, Sput 10 ml, Culture Flask, Filter Membrane 0,2  $\mu\text{m}$ , Eppendorf, Alkohol, Blue tip, White tip, Yellow tip, Falcon 15ml, Falcon 30ml

6. Perlakuan Antibodi Telomerase Pada kultur HeLa

Antibody Deliver IN (AB-DeliverIN), Tris Cl pH 6.8, PBS

7. Imunositokimia

PBS pH 7,4,  $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, 5% FBS, Antibodi telomerase, Biotin, SA-HRP, DAB, Mayer Hematoxylin, Cover glass

#### 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. 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 bisa tinggi.
- *Telomerase mouse 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's Adjuvant (CFA) dan Incomplete Freund's Adjuvant (IFA): CFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian antigen pertama sedangkan IFA digunakan sebagai adjuvan pada penginjeksian (*booster*) selanjutnya. 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 dan Western Blot

- HeLa *cell line*: merupakan sel kanker serviks manusia yang telah dimurnikan dan didiferensiasikan sehingga menjadi *cell line* yang murni.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 1. Produksi Antibodi Telomerase

Antibodi merupakan hasil respon tubuh terhadap benda asing (antigen) yang masuk dalam tubuh, namun berada di luar sel. Antibodi poliklonal merupakan kombinasi molekul imunoglobulin (Ig) yang dihasilkan terhadap beberapa antigen tertentu, dimana setiap antigen akan dikenali oleh tempat perlekatan (epitop) yang berbeda namun masih dalam satu imunoglobulin. Secara umum, apabila hubungan filogenetik semakin jauh, maka potensi titer antibodi bisa tinggi. Kelinci muda dengan umur 10-16 minggu digunakan, dengan harapan maternal IgG semakin tidak terdeteksi. Selain itu, puncak fungsi imun pada kelinci terjadi sewaktu masa pubertasnya. Metodenya (Florida State University, 2007):

1. Dua ratus mikro liter protein *telomerase 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).
2. Dua minggu setelah penginjeksian awal, dilakukan booster pertama menggunakan dua ratus mikro liter dari protein *telomerase 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).
3. Satu minggu setelah booster pertama, pengambilan darah (panen) sdapat dilakukan. Panen dilakukan hingga minggu kelima setelah booster 1, setelah itu dilakukan booster 2. Setelah imunisasi terakhir, sampel darah diambil dari kelinci dan produksi antibodi diidentifikasi melalui Western Blot dan tes ELISA (diterima oleh Regional Medical Sciences Research Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences).

##### 2. Purifikasi Antibodi Telomerase



1. Darah dipanen melalui vena *auricularis* dan dikoleksi serumnya untuk menyiapkan antibodi (IgG).
2. Antibodi dalam serum dipurifikasi menggunakan metode SAS 50 (*Saturated Ammonium Sulphate 50%*) guna mendapatkan konsentrat IgG poliklonal (Liddell, 2003).
3. Pendeteksian Antibodi Telomerase
  1. Western Blot (Abcam, 2010)
    - a. Pembuatan gel telomerase dengan metode SDS PAGE
    - b. Perendaman nitroselulosa dan gel elektroforesis SDS PAGE dalam *transfer buffer* untuk mentransfer protein dari gel ke nitroselulosa
    - c. melakukan setting alat: Trans Blotter Semi Dry merk Bio Rad, susun bahan (*sandwich form*) dari bawah ke atas: 1. Kertas saring, 2. Nitroselulosa, 3. Gel elektroforesis, 4. Kertas saring
    - d. Nitroselulosa direndam dalam Ponceau 1% untuk menunjukkan bahwa telomerase telah tertransfer dari gel ke nitroselulosa. Setelah itu, bilas dengan akuades, lalu blok dengan TBS skim milk 5%
    - e. Keluarkan dalam suhu ruang dan cuci nitroselulosa dengan TBS *tween* 0,05%
    - f. Inkubasi antibodi telomerase dalam TBS skim milk 5%, cuci dengan TBS *tween*. Lanjutkan inkubasi dengan menggunakan anti *rabbit* (Biotin)
    - g. Inkubasikan substrat yang sesuai dengan Biotin untuk memunculkan pita protein. Adanya pita protein mengindikasikan bahwa antibodi anti telomerase (*rabbit-anti human telomerase polyclonal antibody, unconjugated*) telah berhasil diproduksi pada kelinci.
  2. Indirect ELISA (Abcam, 2010)

Untuk memastikan imunogenitas dari telomerase, dilihat hubungan antara *telomerase mouse peptide* terhadap antibodi telomerase menggunakan metode *indirect ELISA (Enzyme Link Immuno Sorbent Assay)*. Secara detail, metodenya: sentrifugasi sampel darah kelinci, encerkan supernatan dengan *Assay buffer* dengan

perbandingan 1:10, 10 $\mu$ L Sampel + 90  $\mu$ L Assay Buffer. Hasil kemudian dimasukkan ke dalam mikroplate ELISA, diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama semalam. Suspensi sampel dicuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Tambahkan 50 $\mu$ L blocking buffer (BSA 1% dalam PBS selama 45 menit). Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 $\mu$ l antibodi primer (anti-telomerase) dalam larutan PBS-BSA 1% dengan perbandingan 1:500 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 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Suspensi diambil dan dicuci dengan PBS-Tween selama 2 @ 5 menit. Tambahkan 50 $\mu$ L Biotin dan inkubasi 30 menit. Cuci dengan PBS-Tween selama 2 @5 menit. Substrat TMB dimasukkan dan diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan NAOH 1 N selama 15 menit. Hasil dibaca pada ELISA reader dengan  $\lambda$  405 nm

#### 4. Kultur Sel HeLa

- a. Sel HeLa dipanen dengan Tripsin-EDTA
- b. Sel HeLa disentrifuge 1500 rpm selama 8 menit
- c. Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan medium kultur (MEM) yang sudah ditambahkan serum
- d. Sel ditanam pada well dan diinkubasi 37 $^{\circ}$ C, 95%udara, 5% CO<sub>2</sub>, 100% kelembapan

#### 5. Perlakuan Antibodi Telomerase pada Kultur HeLa

- a. Siapkan solusi antibodi dan dilusikan antibodi dengan PBS 100  $\mu$ g/ml
- b. Tambahkan 0.4 sampai 70  $\mu$ L reagen Ab-DeliverIN dalam 1 *microtube* Dalam penelitian ini digunakan protokol resmi Ab-DeliverIN, dimana pada HeLa 24 *well*, digunakan antibodi sebanyak 1  $\mu$ g, Ab-DeliverIN 2  $\mu$ l, volume dilusi 100  $\mu$ l, total medium *volume* 500  $\mu$ l.



Tissue Culture Dish	Antibody Quantity ( $\mu\text{g}$ )	Ab-DeliverIN™ ( $\mu\text{L}$ )	Dilution Volume ( $\mu\text{L}$ )	Total Medium Volume
96 well	0.4	0.4	20	120 $\mu\text{L}$
24 well	1	2	100	500 $\mu\text{L}$
12 well	2	4	100	1 mL
6 well	5	10	200	2 mL
60 mm dish	10	20	200	4 mL
90 - 100 mm	30	60	400	8 mL
T-75 flask	35	70	400	10 mL

- c. Tambahkan 4 sampai 350  $\mu\text{L}$  antibodi (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ke Ab-DeliverIN, campurkan dengan cara *pipetting up and down* beberapa kali
  - d. Inkubasikan selama 10-15 menit pada suhu ruang
  - e. Tambahkan 20 sampai 400  $\mu\text{L}$  serum-free medium ke antibodi/Ab-DeliverIN, campur dan dispersikan segera ke dalam sel yang bertumbuh pada medium kultur biasa (dengan serum)
  - f. Inkubasikan sel pada suhu 37°C dalam inkubator CO<sub>2</sub>, pada kondisi standar hingga dilakukan evaluasi efisiensi antibodi (3-48 jam).
6. Imunositokimia
- a. Slide preparat jaringan partikular 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.

- I. Ditetesi dengan *Mayer Hematoxylin* sebagai *Counterstain* (10 menit). Preparat dicuci dengan air mengalir kemudian dibilas dengan aquades dan dikeringanginkan. Lalu preparat *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan cover glass. Preparat positif apabila terdapat warna coklat pada preparat.

#### 4.8 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).