

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan studi empiris dengan pendekatan kuantitatif secara eksperimental murni menggunakan desain true experimental in vitro, post-test only, control group design untuk mengetahui pengaruh supernatan yogurt LBA-ST dalam menurunkan dan menghambat ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 pada cell line kanker serviks (sel HeLa) dengan dosis yang berbeda.

#### 4.2 Besar Sampel

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel HeLa, yaitu *cell line* kanker serviks yang di kultur. Uji aktivitas Laminin5- $\gamma$ 2 dengan imunositokimia pada sel HeLa yang telah dipapar dengan supernatan yogurt dan kontrol sel HeLa (tanpa dipapar supernatan yogurt).

##### 4.2.1 Pengujian Ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2

Pengamatan ekspresi protein Laminin5- $\gamma$ 2 dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan menggunakan perbesaran total yaitu 40x, 100x, 200x, 400x, dan 1000x dengan konsentrasi Supernatan Yogurt (10%, 20%, 40%) v/v yang terbagi dalam 3 sampel dan per sampelnya difoto dalam 5 lapang pandang.

#### Index Ekspresi Protein



Gambar 4.1 Kriteria Indeks Ekspresi Protein Laminin5- $\gamma$ 2

Kemudian dilakukan penghitungan indeks ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 menggunakan

rumus :

- **Skor ekspresi protein per lapang pandang** = [(jumlah sel sesuai kriteria) x indeks] : jumlah tiap lapang pandang
- **Total skor ekspresi protein** = hasil penjumlahan skor ekspresi protein tiap lapang pandang

**Tabel 4.1 Pembagian Kelompok Perlakuan Pengujian Ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2**

No	Kelompok	Perlakuan Ekstrak
1	Kontrol positif = 3 dosis x3 pengulangan = 9 well plate	Ditambahkan supernatan yogurt LBA-ST dengan konsentrasi dosis (10%,20%, dan 40%) v/v
2	Kontrol negatif = 3 well plate	Ditambahkan 1000 $\mu$ L medium kultur ke dalam sumuran Sel HeLa tanpa pemberian supernatan yogurt LBA-ST
3	Kontrol tanpa antibodi = 2 well plate	Tanpa pemberian antibodi primer

**Total = 2 well plate + 3 plate + 9 Plate = 14 plate**

**Imunositokimia**  $\rightarrow$  Total volume 1 well adalah 1000 $\mu$ L

- Dosis 10% v/v =  $(10 / 100) \times 1000\mu\text{L} = 100\mu\text{L}$  supernatan yogurt + 900 $\mu$ L media kultur
- Dosis 20% v/v =  $(20 / 100) \times 2000\mu\text{L} = 200\mu\text{L}$  supernatan yogurt + 800 $\mu$ L media kultur
- Dosis 40% v/v =  $(40 / 100) \times 4000\mu\text{L} = 400\mu\text{L}$  supernatan yogurt + 600 $\mu$ L media kultur

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas Penelitian

Dosis (konsentrasi) Supernatan Yogurt LBA-ST (*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermopilus*) yang dipaparkan pada Sel HeLa dan waktu inkubasi selama 24 jam

#### 4.3.2 Variabel Tergantung Penelitian

Aktivitas Laminin5- $\gamma$ 2 pada Sel HeLa setelah dipapar Supernatan Yogurt LBA-ST (*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*).

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan bulan Maret – Juni 2014. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu Universitas Gadjah Mada untuk kultur sel HeLa, Laboratorium Patologi dan Anatomi FKUB untuk foto sel HeLa yang telah diberi perlakuan maupun kontrol, dan Laboratorium Biokimia FKUB Malang untuk imunositokimia terhadap aktivitas Laminin5- $\gamma$ 2.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. **Starter Yogurt (Yogourmet t.m)** didapat dari pabrik sentral Yogurt Junrejo, Batu, Jawa Timur.
2. **Sel HeLa** diperoleh dari Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
3. **LBA adalah Lactobacillus Bulgaricus** yang terdiri dari 2 bakteri *Lactobacillus* sp. Berbentuk batang dan gram positif, tidak membentuk spora, homofermentative dan tes katalase negatif. Untuk *Lactobacillus* *Achidophilus* banyak ditemukan di sistem intestine, rongga mulut serta vagina (Danisco,2008). Kedua bakteri ini banyak ditemukan di kefir dan sekarang banyak digunakan sebagai makanan probiotik dan suplemen (Danisco,2008).
4. **ST adalah Streptococcus Thermophilus** adalah bakteri gram positif berbentuk bulat cenderung lonjong serta termasuk anaerob fakultatif, sehingga masih tahan dengan lingkungan dengan sedikit oksigen.



Hormofermentatif dengan suhu optimum bakteri 45°C (Luciana et al, 2014)

5. **Laminin5-γ2 ( Protein ECM )**, Laminin-5 (Ln-5) adalah glikoprotein heterotrimerik bagian dari struktur hemidesmosom pada membran basal dan epitel permukaan yang berkaitan dengan jaringan ikat pendukungnya. Sel epithelial mendesposisikan Ln-5 selama migrasi sel, dimana MMP-2 dan mTLD memecah rantai α2Ln-5 yang menginduksi migrasi sel. Selain itu peranan integrin Laminin pada komponen protein reseptor *epidermal growth factor receptor* (EGFR) juga memiliki arti penting pada proses migrasi dan invasi sel kanker.
6. **Penghitungan Indeks ekspresi Laminin5-γ2** dilakukan dengan menghitung sel yang mengekspresikan Laminin5-γ2 yang ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma dan inti sel dibandingkan dengan jumlah total sel pada setiap lapang pandang sebagai Indeks Ekspresi Laminin5-γ2.

#### **4.6 Bahan dan Alat atau Instrumen Penelitian**

##### **4.6.1 Kultur sel HeLa**

Sel HeLa, medium RPMI 1640, mikropipet (blue tip dan yellow tip), tabung sentrifugal steril, FBS (Fetal Bovine Serum), PBS (Phosphate Buffer Saline), sodium Bicarbonate, HCl (asam klorida), Trypsin-EDTA, aquadest, laminar air-flow, inkubator 37°C ± 5% CO<sub>2</sub>, mikroskop inverted, 96-well plates, cover glass, alat sentrifugator, pipet disposable, pipet tetes steril, hemasitometer, syringe 3 ml, filter 0.2 μm.

#### 4.6.2 Fermentasi Yogurt LBA – ST

Satu liter susu murni, kompor, panci, starter yogurt merk yoguormet t.m, inkubator, refrigerator.

#### 4.6.3 Preparasi Supernatan, *Whole* Yogurt, dan Bakteri

Yogurt LBA-ST yang sudah siap digunakan, 4 buah Falcon @50 ml, kertas saring whatman, alat sentrifugator, pipet disposable, tabung sentrifugal steril, refrigerator.

#### 4.6.4 Pemaparan pada Kultur Sel

Supernatan Yogurt LBA-ST, sel HeLa, plate, Label, Pipet tetes.

#### 4.6.5 Pengujian Ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 menggunakan Metode Imunositokimia

Sel HeLa, incubator CO<sub>2</sub>, stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, PBS (Phosphate Buffer Saline), metanol, larutan hidrogen peroksida, larutan substrat kromogen diaminobenzidine, novostain universal detection kit, antibodi monoklonal primer untuk Laminin5- $\gamma$ 2, xylol, mounting media, mikropipet (20, 200, 1000  $\mu$ L), tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, vortex, cover slip, object glass, 24-well plate, 6-well plate, pinset, pipet tetes, laminair air-flow, label, akuades, blue tip, yellow tip, buangan untuk media bekas, mikroskop cahaya.

### 4.7 Prosedur Penelitian

#### 4.7.1 Kultur Sel HeLa

1. Sel HeLa dikultur pada media RPMI 1640 yang telah tersuplementasi 10% (v/v) dengan FBS dan asam amino non esensial.
2. Sel dihitung menggunakan standart hemasitometer.
3. Untuk pengujian, sel HeLa dipanen dengan Trypsin-EDTA, disentrifuge 1500 rpm selama 8 menit.

4. supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan medium kultur yang sudah ditambahkan.
5. Sel ditanam pada sumuran yang telah dijelaskan sebelumnya dan diinkubasi 37°C, 95% udara, 5% CO<sub>2</sub>, 100% kelembaban.

#### 4.7.2 Fermentasi Yogurt LBA – ST

1. Panaskan satu liter susu pada suhu 82-100°C.
2. Dinginkan susu yang telah dipanaskan sampai suhunya turun menjadi 42-44°C.
3. Larutkan 5gram strater yogurt (yoguormet t.m) yang berisi bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (LBA-ST) pada secankir susu yang masih hangat, aduk merata kemudian campurkan pada satu liter susu, aduk secara homogen.
4. Inkubasi pada suhu 4°C selama empat setengah jam atau sampai pH nya 4 -5. Fermentasi dihentikan dengan menyimpannya pada refrigerator sampai yogurt akan digunakan.

#### 4.7.3 Preparasi Supernatan, *Whole* Yogurt, dan Bakteri

1. Yogurt dimasukkan kedalam Falcon 50mL sebanyak 4 falcon.
2. Disentrifuge selama 15 menit 4000rpm.
3. Supernatan dipisahkan dengan pelet (bakteri).
4. Disaring menggunakan kertas saring whatman.
5. Disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk perlakuan.

#### 4.7.4 Pemaparan pada Kultur Sel

1. Diencerkan Supernatan Yogurt LBA-ST dengan jumlah dan konsentrasi yang diinginkan (10%,20%, dan 40%)v/v di medium sel HeLa.



2. Ditambahkan larutan Supernatan Yogurt LBA-ST ke dalam *plate*, didiamkan selama 24 jam.
3. Dicuci kembali larutan Supernatan Yogurt LBA-ST dengan medium sel.

#### 4.7.5 Pengujian Ekspresi Laminin5-y2 menggunakan Metode Imunositokimia (CRCC,2009)

1. Lakukan persiapan seperti pada Protokol Persiapan Kerja In Vitro di Laboratorium.
2. Ambil sel dari inkubator CO<sub>2</sub>, amati kondisi sel.
3. Panen sel sesuai dengan protokol panen.
4. Hitung jumlah sel sesuai dengan protokol penghitungan sel, Jumlah sel yang dibutuhkan untuk uji imunositokimia adalah  $5 \times 10^4$  sel/sumuran ( $5 \times 10^4$  sel/1000  $\mu$ l MK).
5. Buat pengenceran suspensi sel sehingga konsentrasi sel akhir  $5 \times 10^4$  sel/1000  $\mu$ l MK.
6. Siapkan 24 well plate dan cover slip.
7. Masukkan cover slip sejumlah yang dibutuhkan ke dalam sumuran menggunakan pinset dengan hati-hati.
8. Transfer 1000  $\mu$ l suspensi sel ke atas cover slip, Caranya, masukkan 200  $\mu$ l suspensi sel tepat di atas coverslip secara merata, kemudian diamkan selama 30 menit dalam incubator agar sel menempel pada coverslip, selanjutnya tambahkan 800  $\mu$ l MK ke dalam sumuran secara perlahan. Setiap akan mengisi sumuran, resuspensi sel kembali.
9. Amati keadaan sel di mikroskop untuk melihat distribusi sel.

10. Inkubasi sel di dalam inkubator selama semalam. Jika dalam waktu semalam kondisi sel belum pulih, ganti media sel (MK) dan inkubasikan kembali.
11. Setelah sel normal kembali, segera buat satukonsentrasi sampel, yaitu pada  $IC_{50}$  untuk perlakuan sebanyak 1000  $\mu$ l.
12. Ambil 24 well plate yang telah berisi sel dari inkubator  $CO_2$ .
13. Buang semua MK dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
14. Isikan PBS masing-masing 500  $\mu$ l ke dalam sumuran untuk mencuci sel.
15. Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan-lahan.
16. Masukkan sampel sebanyak 1000  $\mu$ l ke dalam sumuran.
17. Masukkan 1000  $\mu$ l MK untuk kontrol sel (2 kontrol sel).
18. Inkubasi di dalam inkubator  $CO_2$  selama 15 jam.
19. Amati kondisi sel setelah 14 jam, dokumentasikan dengan kamera.
20. Siapkan metanol dingin dan PBS.
21. Pada jam ke-15, inkubasi dengan sampel dihentikan.
22. Buang semua media dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
23. Isikan PBS 500  $\mu$ l ke dalam masing-masing sumuran secara perlahan untuk mencuci sel.
24. Buang PBS dari sumuran dengan pipet Pasteur secara perlahan.
25. Ambil cover slip menggunakan pinset dengan bantuan ujung jarum dengan hati-hati.



26. Letakkan di dalam sumuran 6-well plate bekas atau dish bekas yang bersih.
27. Beri label pada masing-masing sumuran, teteskan 300  $\mu$ l metanol dingin, inkubasi 10 menit di dalam freezer.
28. Buang metanol secara perlahan, jangan sampai cover slip terbalik.
29. Tambahkan 500  $\mu$ l PBS pada cover slip, diamkan selama 5 menit. Ambil dan buang PBS dengan mikropipet 1 ml, lakukan pencucian dengan PBS 2 kali.
30. Tambahkan 500  $\mu$ l akuades, diamkan selama 5 menit. Buang akuades. Lakukan pencucian dengan akuades 2 kali.
31. Teteskan larutan hidrogen peroksida (blocking solution). Inkubasi selama 10 menit. Buang larutan dengan mikropipet.
32. Teteskan prediluted blocking serum. Inkubasi selama 10 menit, buang larutan.
33. Teteskan antibodi monoklonal primer yaitu Laminin5- $\gamma$ 2 untuk antigen yang ingin diamati inkubasi selama 10 menit.
34. Tambahkan 500  $\mu$ l PBS. Inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
35. Teteskan antibodi sekunder yang dilabel biotin (biotinylated universal secondary antibody), inkubasi selama 10 menit.
36. Tambahkan 500  $\mu$ l PBS. Inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
37. Teteskan reagen yang berisi kompleks streptavidin-enzim peroksidase, inkubasi selama 10 menit.
38. Tambahkan 500  $\mu$ l PBS. Inkubasi selama 5 menit, buang PBS.
39. Teteskan larutan substrat kromogen DAB, inkubasi selama 10 menit.
40. Tambahkan akuades 500  $\mu$ l, kemudian buang kembali.

41. Teteskan larutan MayeHaematoxylin, inkubasi selama 3 menit.
42. Tambahkan akuades 500 µl, kemudian buang kembali.
43. Angkat cover slip dengan pinset secara hati-hati, kemudian celupkan dalam xylol.
44. Celupkan cover slip dalam alkohol, keringkan cover slip.
45. Letakkan cover slip di atas object glass, tetesi dengan lem (mounting media). Tutup cover slip dengan cover slip kotak.
46. Pengamatan ekspresi Laminin5-γ2 dilakukan dengan mikroskop cahaya diamati dengan perbesaran 400 x lalu difoto
47. Dilakukan penghitungan indeks ekspresi Laminin5-γ2 menggunakan rumus Indeks ekspresi Laminin5-γ2 =

$$\frac{\sum \text{sel yang mengekspresikan Laminin5-}\gamma\text{2}}{\sum \text{total sel}} \times 100\%$$

#### 4.8 Analisis Data

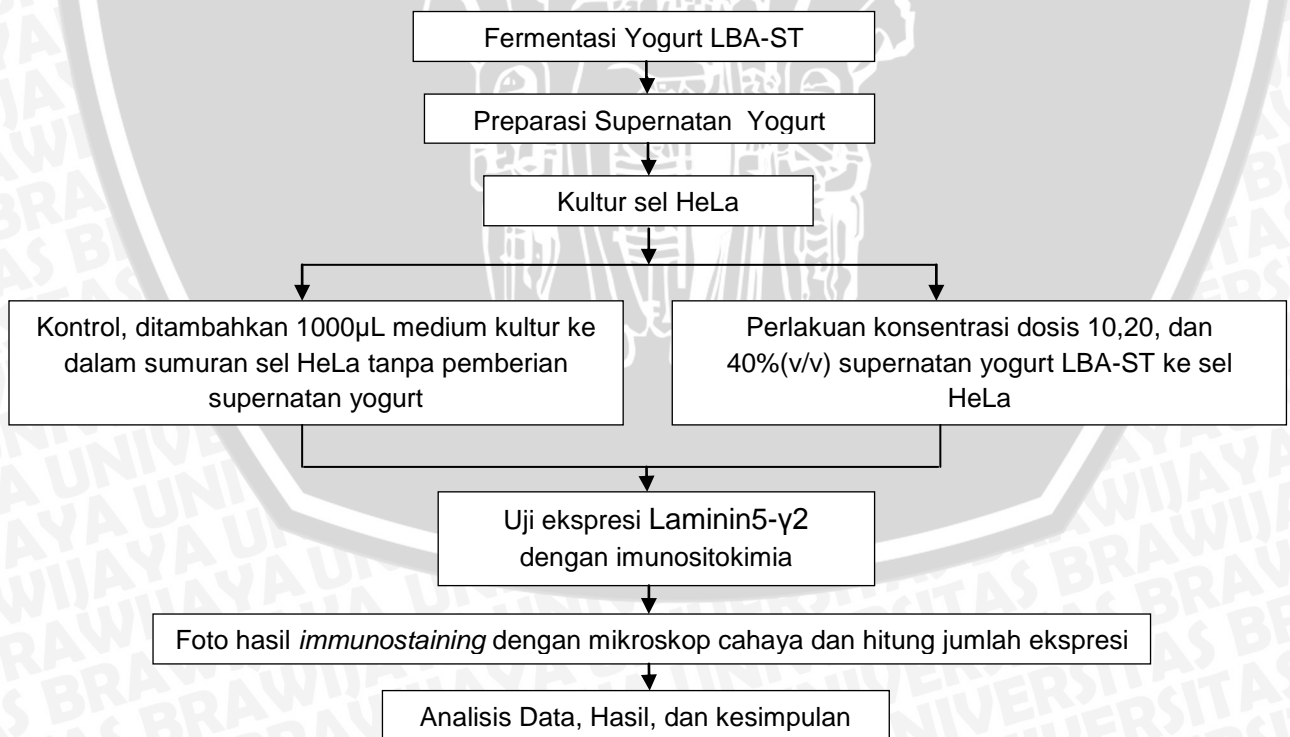
Data yang telah terkumpul dianalisa secara statistik dengan menggunakan program SPSS 16 for Windows 7. Dilakukan uji normalitas menggunakan rumus dari Saphiro Wilk melalui program SPSS. Distribusi data dikatakan normal bila hasil signifikansi lebih besar dari 0,05 ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas data, data dikatakan homogen bila signifikansi lebih besar dari 0.05 ( $p > 0.05$ ). Bila data sudah diuji terbukti terdistribusi normal dan data homogen dilanjutkan uji statistik data menggunakan one way ANOVA, yaitu analisis varians untuk satu variabel bebas dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh dosis supernatan yogurt LBA-ST terhadap aktivitas antiproliferasi dan ekspresi Laminin5-γ2 . Dengan tingkat kepercayaan 0,05 ( $p = 0,05$ ) dan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ). Apabila diperoleh  $p > 0,05$  artinya tidak ada perbedaan signifikan,

sebaliknya bila  $p < 0,05$  menunjukkan ada perbedaan yang signifikan. Sedangkan hipotesis statistik ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 adalah :

$H_0$  (H null): Tidak terjadi penurunan jumlah sel line kanker serviks(HeLa cell) yang mengekspresikan Laminin5- $\gamma$ 2, menunjukkan bahwa tidak terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami penurunan ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 setelah diberikan supernatan yogurt LBA-ST (*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*).

$H_1$ (H alternatif): Terjadi penurunan jumlah sel line kanker serviks(HeLa cell) yang mengekspresikan Laminin5- $\gamma$ 2, menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah sel yang mengalami penurunan ekspresi Laminin5- $\gamma$ 2 setelah diberikan Supernatan Yogurt LBA-ST(*Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus*).

#### 4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian