

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 Subjek Penelitian

Subjek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *HeLa cell line* dengan fasase 12.

4.3 Variabel Penelitian

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

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat proliferasi (dengan penurunan proliferasi sel menunjukkan apoptosis) berdasarkan metabolisme pernafasan sel HeLa setelah perlakuan dengan MTT assay.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan mulai pada bulan Februari s.d. Juli 2014 di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Instrumen Penelitian

4.5.1 Kultur Sel HeLa

Dalam melakukan kultur sel HeLa dibutuhkan :

1. Trypsin-EDTA 30ml
2. MEM Sigma 3 satchet
3. PBS 1 L
4. Deionized water 1 L
5. Fetal Bovine Serum 5 ml
6. Sduit 10 ml 30 biji
7. Culture Flask 1 pak kecil
8. Eppendorf 250 biji
9. Alkohol 2 L
10. Falcon 30ml 10 biji
11. HeLa Cell line 1 t-flask
12. Yellow tip 100 buah
13. Blue tip 100 buah

4.5.2 Perlakuan Antibodi E6 pada Sel HeLa

Perlakuan Antibodi E6 terhadap sel HeLa menggunakan bahan berikut :

1. Antibody Deliver IN (ABDeliverIN) 70 μ l
2. Tris Cl pH 6.8 20 ml
3. PBS 100ml

4.5.3 MTT assay

Dalam MTT assay digunakan bahan :

1. *MTT reagents* 25mL
2. *Detergent reagent* 2 x 125 mL
3. *Plate* 96 well

4.6 Definisi Operasional

E6 human peptide merupakan antigen berupa protein E6 sel kanker pada manusia yang digunakan untuk menginduksi terbentuknya antibodi E6 pada kelinci.

Antibodi E6 merupakan antibodi yang dihasilkan oleh kelinci karena induksi antigen yang diinjeksi ke dalam tubuh kelinci.

HeLa *cell line* merupakan sel kanker leher rahim manusia yang telah dimurnikan dan didiferensiasikan sehingga menjadi *cell line* yang murni.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur Sel HeLa

Sel HeLa yang masih dalam keadaan beku dilelehkan (*thawing*). Setelah itu, dilakukan subkultur pada sel HeLa adheren (*monolayer*). Sel yang telah berhasil disubkultur, dipindahkan ke sumur-sumur (*wells*), diinkubasi pada kondisi kelembaban 100%, suhu 37°C, *confluent* 70%.

4.7.2 Perlakuan Antibodi E6 pada Sel HeLa

Sel HeLa dipaparkan pada antibodi E6 dengan kadar 0.5µg, 1µg, dan 2µg. Karena E6 berada pada inti sel, maka antibodi E6 dibawa ke dalam inti sel melalui agen penghantar antibodi, yaitu AB-DeliverIN. Dosis efektif AB-DeliverIN agar mampu menghantarkan antibodi E6 secara maksimal ialah 2 µl.

Sel HeLa ditempatkan pada *plate* 96 *wells* yang ditujukan untuk MTT Assay dimana akan dianalisis korelasi peningkatan dosis antibodi E6 yang mampu menginduksi apoptosis sel HeLa..

4.7.3 Pengukuran Jumlah Sel yang Hidup dengan MTT Assay

Jumlah sel yang hidup setelah perlakuan dapat dilihat melalui pengamatan hasil absorbansi metabolit sel hidup yang bernapas. Kecenderungan penurunan ataupun peningkatan proliferasi sel HeLa dapat dilihat pada hasil MTT Assay. MTT Assay dilakukan pada sel HeLa 96 *wells* yang telah 6 hari mendapatkan perlakuan antibodi E6.

Pembacaan absorbansi dilakukan terhadap ELISA / *microplate reader* tempat inkubasi sel HeLa pada panjang gelombang 570 nm.

4.8 Analisis Statistik

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, digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun jika tidak sama menggunakan *Kruskal Wallis*. Untuk melihat perbedaan tiap kelompok digunakan uji *Post Hoc*. Penelitian bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS 17.

