

## BAB VI

## PEMBAHASAN

## 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Kanker merupakan sekumpulan sel yang mampu membelah secara terus menerus dan berubah sifat menjadi *immortal* karena sel kanker tidak memiliki waktu paruh dalam pembelahan sel dan tidak memiliki faktor yang meregulasi kematian sel. Elizabeth, Carol, dan Jack menemukan protein telomerase sehingga meraih *prize nobel of medicine* pada tahun 2009. Protein telomerase inilah yang menjadi factor kunci dalam meregulasi kematian sel.

Human papilloma virus telah diketahui sebagai penyebab mutlak dari kanker serviks terutama tipe 16 dan 18, sel serviks yang terinfeksi oleh HPV akan mengekspresikan berbagai macam protein diantaranya protein E6 dan protein E7. Protein inilah yang menyebabkan terganggunya regulasi dari protein telomerase sehingga sel menjadi *immortal*. Selain itu Protein E6 dan E7 juga menonaktifkan protein p53 dan PRb sehingga sel normal perlahan-lahan akan membentuk lesi pra kanker, atau CIN. Proses tersebut berlangsung secara terus menerus sehingga terjadi peningkatan grade CIN dari grade 1 2 dan 3 dan bermanifestasi klinis menjadi kanker serviks. Apabila sudah terjadi kerusakan jaringan, maka sel kanker dapat dengan mudah bermigrasi jauh dari tempat asalnya untuk menularkan sifat keganasannya pada sel normal. Hal inilah yg menyebabkan kanker memiliki angka morbiditas dan mortalitas yg sangat tinggi.



Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh bukti bahwa siRNA E6 mampu menurunkan ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell line) sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen terapi kanker serviks. Pada penelitian ini siRNA E6 melalui immunositokimia terbukti dapat menurunkan ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell line) ditandai dengan adanya peningkatan dari pulasan warna coklat (gambar 5.3-5.6) seiring dengan peningkatan dosis siRNA yang diberikan.

Subjek pada penelitian ini adalah sel kanker serviks dari kultur HeLa *cell line*. Sel *HeLa* yang telah disubkultur dalam *plate 12-well* kemudian dipaparkan dengan siRNA E6 yang telah terkonjugasi dengan *Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000* dengan dosis paparan siRNA E6 sebesar 0 µg sebagai kontrol, 0,5 µg, 1 µg, dan 2 µg. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan immunositokimia dengan antibodi primer, antibodi telomerase. Antibodi telomerase didapatkan dengan menginjeksikan antigen telomerase ke dalam tubuh kelinci jantan berusia 14-16 minggu. Darah yang mengandung serum antibodi poliklonal telomerase yang telah dipanen dideteksi ikatannya dengan menggunakan Western Blot dan ELISA. Dari hasil Western blot dan ELISA menunjukkan bahwa antibodi telomerase telah berhasil diproduksi oleh tubuh kelinci.

Antibodi dibentuk oleh sistem imun akibat masuknya antigen ke dalam tubuh. Bila antigen masuk ke dalam tubuh, maka ia akan dikenali sebagai bahan yang terikat dengan reseptor *Human Leukocyte Antigen (HLA)* tertentu pada makrofag. Makrofag mencerna molekul asing tersebut dan menampilkan ikatan tertentu dari kelompok luar atom yang disebut *epitop* pada permukaan dari makrofag. Epitop tersebut kemudian kontak dengan limfosit T helper, yang meno-



long menampilkan epitop tersebut pada limfosit sel B. Sel B akan mensintesa rantai protein immunoglobulin yang mampu mengikat epitop secara spesifik. Setiap bahan antigen memiliki epitop yang banyak, yang mampu berikatan dengan antibodi. Secara in vivo, respons terhadap antigen dapat bersifat luas dan antibodi yang bereaksi dengan determinan-determinan pada antigen ini disebut *antibodi poliklonal*.

Prinsip dari metode imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim dengan substrat. Pemeriksaan imunohistokimia dimaksudkan untuk mengenali bahan spesifik tertentu didalam jaringan dengan menggunakan antibodi dan sistem deteksi yang memungkinkan untuk mengenali bahan spesifik tersebut secara visual. Antibodi-antibodi penentu (anti-antibodi dari spesies lain) ini ditemplei (tagged) dengan beberapa *reporter molecule* yang dapat mengkatalisa reaksi selanjutnya menuju produk yang dapat dilihat. Sistem deteksi Avidin-biotin complex (ABC) menggunakan spesimen sel tertanam dalam paraffin, dengan ketebalan 5 mikron. Antibodi spesifik terhadap bahan spesifik yang diperiksa dikombinasi dengan antigen. Antibodi ini ditentukan dengan anti-antibodi yang dihasilkan oleh spesies lain yang mengenal antibodi pertama sebagai antigen. Anti-antibodi (antibodi sekunder) ini mempunyai molekul biotin yang lekat padanya, memungkinkan deteksi lanjut dengan protein avidin.

Molekul Horse Radish Peroxidase (HRP) adalah molekul reporter. Enzim ini diikat oleh biotin dan berpadu didalam complex avidin-biotin sedemikian rupa sehingga bila HRP ini berdekatan dengan anti-antibodi terbiotinil

sekunder (secondary biotinylated anti-antibody), complex tersebut berikatan dengan tempat ikatan biotin pada satu dari molekul avidin. Hal ini membuat enzim pada tempat asli dari interaksi antibodi primer-antigen.

Kemudian enzim tersebut bereaksi dengan hydrogen peroxidase. Hal ini menimbulkan transfer elektron-elektron dari senyawa chromogen yang mengendap (precipitates) sebagai pigmen yang tidak larut (insoluble). Chromogen yang digunakan adalah 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB). Bila teroksidasi molekul ini didalam larutan dalam konsentrasi terlarut akan mengendap berupa massa coklat gelap (positif).

Dari hasil immunositokimia, didapatkan dosis siRNA 0,5 µg, 1 µg dan 2 µg yang diberikan pada kultur sel HeLa terjadi perubahan pulasan warna inti sel HeLa menjadi coklat. Hal ini menandakan bahwa seiring dengan peningkatan dosis siRNA yang diberikan, terdapat peningkatan ikatan antara antibodi telomerase dengan antigen telomerase yang menandakan bahwa tingkat proliferasi sel HeLa menurun dan terjadi kematian dan sel kanker serviks secara kualitatif. Hal tersebut membuktikan hipotesis penelitian yang menyatakan bahwa siRNA E6 mampu menurunkan ekspresi protein E6 pada kultur sel kanker serviks (HeLa cell line). Oleh karena itu *siRNA E6* dapat dijadikan metode alternatif dalam terapi kanker leher rahim dalam tahap in vitro melalui pengamatan immunositokimia.

## 6.2 Implikasi terhadap Bidang Kedokteran

Penelitian ini diharapkan dapat membuka wawasan dan pengetahuan mengenai potensi siRNA e6 pada kultur sel HeLa serta pengaruhnya terhadap ekspresi protein E6 sehingga dapat menjadi bahan kajian lebih lanjut tentang potensi pengobatan alternatif untuk mengobati kanker serviks. siRNA E6 mampu menghambat kerja dari protein E6 secara spesifik sehingga menimbulkan efek samping yang minimal pada sel normal.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan pada penelitian ini adalah peneliti belum dapat membuktikan potensi siRNA E6 dalam menurunkan ekspresi protein E6 secara kuantitatif karena hanya menggunakan pengecatan immunohistokimia yang menghasilkan data kualitatif.

