

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif. Penelitian ini merupakan penelitian *in vitro* pada spesimen jaringan mukosa mulut normal dan sel galur kanker mulut yang dikultur di Laboratorium Biologi Oral FKGUI.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Spesimen kontrol berupa gingiva berukuran 2 x 2 x 2 mm didapatkan dari pasien yang menjalani odontektomi di klinik Bedah Mulut FKG UI pada periode Mei-Juli 2008. Sebanyak 27 spesimen kontrol dikumpulkan dan dianalisa dalam penelitian ini.

Sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut HSC-3 dan HSC-4 didapatkan dari Laboratorium Biologi Oral FKG UI.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia pada periode Mei-November 2008.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Terikat

Sel galur karsinoma sel skuamosa oral tipe HSC-3 dan HSC-4 dan mukosa normal.

4.4.2. Variabel Bebas

Profil protein pada sel HSC-3 dan HSC-4 serta mukosa mulut normal.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1. Profil protein

Keberadaan, jumlah, ketebalan dan berat molekuler dari pita protein yang nampak pada gel SDS-PAGE berdasarkan *standar protein ladder Invitrogen See Blue Plus 2* dengan pewarnaan *Comassie Blue 0,05%*.

4.5.2. Skoring band

Penilaian tingkat ketebalan dan kegelapan yang ditampilkan oleh *band* pada visualisasi *Gel Doc*, terbagi menjadi 5 kategori: sangat tebal (++++), tebal (+++), sedang (++) , tipis (+), tidak terlihat (-).

4.5.3. Mukosa Normal

Jaringan mukosa yang diambil dari pasien odontektomi Klinik Bedah Mulut FKG UI sebagai variabel kontrol

4.5.4. Sel Galur HSC-3

Sel galur KSSRM dengan mutasi *insersi* p53 yang kemudian dikultur dan diekstrak proteinnya menggunakan *kit Trizol* untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.5. Sel Galur HSC-4

Sel galur KSSRM dengan mutasi *missence* p53 yang kemudian dikultur dan diekstrak proteinnya menggunakan *kit Trizol* untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.6. SDS-PAGE

Metode pemisahan protein suatu jaringan atau sel galur kultur berdasarkan berat molekulnya melalui proses elektroforesis.

4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

4.6.1 Kultur Sel Galur Kanker Mulut

Alat dan Bahan:

Alat:

1. *Centrifuge*
2. Pipet *Eppendorf*
3. Stirer plate
4. Pipet *pasteur*

Bahan:

1. DMEM *High Glucose L-Glutamine*
2. FBS (*Fetal Bovine Serum*)
3. *Penstrap*
4. *Fungizone*
5. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

5. *Becker glass*
6. *Tube* 15 ml
7. *Tube* 50 ml
8. Pipet tips 1000 μ L dan 200 μ L
9. *Tissue culture dish*
10. Timer
11. *Syringe* 50 ml
12. Filter
13. *Scraper*
14. *Waterbath*
15. Inkubator
16. *Bio Safety Cabinet* (Laminar flow)
17. *Cryopreservation*

4.6.1.1 Prosedur Membangunkan Sel

1. Siapkan 10 ml medium ke dalam *tube*
2. Ambil *cell line* HSC-3 dan HSC-4 dari dalam tabung nitrogen
3. Lakukan “quick thaw” sampai seluruhnya mencair
4. Pindahkan ke dalam *tube* 15 ml dengan pipet yang telah terisi medium kemudian pipetting
5. Lakukan sentrifugasi 90 x g selama 5 menit
 - ➔ Akan terbentuk pellet dan supernatan, supernatant dibuang sementara pellet yang merupakan endapan sell dipertahankan
6. Siapkan medium untuk *petri disc* sebanyak masing-masing 5 ml pada 4 buah petri (2 HSC-3 dan 2 HSC4) dengan menggunakan pipet pasteur
7. Tambahkan 5 ml DMEM ke pellet di dalam *tube* kemudian pipetting
8. Spread sel yang ada di dalam *tube* (@ 2,5 ml) ke *petri disc* yang sebelumnya sudah terisi 5 ml DMEM

Prosedur membuat medium DMEM lengkap (High glucose L glutamine)

➔ Memiliki komposisi tambahan: antibiotic, anti jamur dan serum

1. Buat dalam 50 ml *tube falcon*
2. Masukkan DMEM sebanyak 45 ml ke dalam *tube*
3. Tambahkan *Fetal Bovine Serum* (FBS) sebanyak 5 ml
4. Tambahkan *Pen strap* 10 mikroliter
5. Tambahkan *Fungizone* 10 mikroliter
6. Beri label “DMEM complete” pada *tube*

4.6.1.2 Prosedur Penggantian Medium Sel:

1. Keluarkan sel pada *petri disc* dari *incubator*
2. Perhatikan dengan mikroskop inverted untuk memastikan perlu tidaknya medium diganti
3. Jika perlu maka langkah selanjutnya adalah mempersiapkan *laminar flow*, alat dan bahan yang akan digunakan untuk mengganti medium sebelumnya sudah disterilisasi dengan sinar UV selama 10 menit
4. Sebelum masuk ke laminar, cawan dan tangan operator disemprot dahulu dengan alkohol agar steril
5. Medium awal dibuang dengan pipet Pasteur
6. Sescara perlahan, bilas cawan tersebut dengan PBS secara merata, langkah ini dulangi sebanyak 3 kali agar sel-sel yang masih hidup pada cawan benar-benar bersih
7. Masukkan medium baru (DMEM) sebanyak 5 ml
8. Tutup cawan dan keluarkan dari laminar
9. Cek kondisi sel dengan mikroskop
10. Jika kondisi sel baik maka masukkan cawan ke dalam *incubator*
11. Terakhir, rapihkan semua alat dan bahan serta buang sampah yang ada di dalam laminar
12. Semprot laminar dengan alkohol, sinari UV 10 menit setelah itu matikan mesin

4.6.1.3 Prosedur *Harvesting Cells* (Memanen Sel):

1. Semua alat di UV terlebih dahulu selama 10 menit
2. Buang medium lalu cuci dengan PBS secara merata selama 3 kali menggunakan pipet Pasteur
3. Kerok sel-sel yang berada pada permukaan cawan dengan sebelumnya ditambahkan PBS menggunakan scraper, ulangi sampai kira-kira semua sel terlepas dari permukaan cawan
4. Pindahkan ke fresh *tube* 15 ml (PBS + sel kurang lebih 5 ml)
5. Putar pada *centrifuge* 2000 g, suhu 24 °C, 10 menit
6. Akan terlihat pellet di dasar *tube*, kemudian buang supernatant (PBS)
7. Beri medium baru sebanyak 5 ml kemudian di pipetting
8. Pindahkan ke cawan baru dengan disebar merata
9. Cek pada mikroskop dan pindahkan ke dalam *incubator*

4.6.1.4 Prosedur Membuat DMEM (Dulbecco's Modified Essentials Medium)

Lengkap:

1. Masukkan DMEM ke dalam *falcone*
2. Tambahkan *penstrap*, *fungizone*, dan PBS ke dalam *falcone*
3. Siapkan *falcone* baru dan saringan kemudian tuang larutan tersebut ke *falcone* sambil disaring

4.6.2 Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein dari sel HSC-3 dan HSC-4 dilakukan dengan Kit *Trizol* (Invitrogen) sesuai dengan instruksi produk. Hasil ekstraksi protein disimpan pada suhu -20°C, sampai saat analisis SDS-PAGE dilakukan.

Alat dan Bahan:

Alat:

1. Mortar dan Pastel
2. *Centrifuge*
3. Vortex

Bahan:

1. *Trizol*
2. *Chloroform*
3. Etanol 100%
4. Isopropanol
5. Guanidine HCl 0,3 M

4. Pipet *Eppendorf*
5. Timbangan
6. Epis 1,5 ml
7. *Tube* 15 ml
8. Pipet tips 1000 μ L dan 200 μ L
9. Blade
10. *Tissue Culture dish*
11. Timer
12. Ice Box
13. Keranjang sterilisasi
14. *Autoclave*
15. Alumunium Foil

4.6.2.1 Ekstraksi Protein Jaringan Mukosa Normal

Langkah Kerja

Tahap Homogenisasi

1. Timbang jaringan menggunakan timbangan OHAUS explorer
2. Cacah jaringan dengan blade di *petri disc* yang dialasi dengan es
3. Masukkan jaringan ke dalam mortal dan tumbuk jaringan dengan pastel hingga halus
4. Masukkan *Trizol* 1ml per 50 mg jaringan lalu pindahkan ke dalam epis 1,5 ml dengan menggunakan pipet 1000 μ l
5. Inkubasi 5 menit, 15-30°C
6. Masukkan *chloroform* 200 μ l / 1 ml *Trizol*
7. Shake by hand 15 detik
8. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C
9. Sentrifuge 12000 x g selama 15 menit pada suhu 2-8°C
10. Setelah disentrifugasi akan tampak tiga lapisan di dalam epis, yaitu lower red, phenol *chloroform* phase (interphase) dan *colorless upper aqueous phase* (lapisan teratas yang bening). Buang lapisan *colorless upper aqueous phase* dengan pipet *eppendorf*

Tahap DNA Precipitation

11. Tambahkan 300 μ l ethanol 100% / 1 ml *Trizol* reagent ke dalam epis lalu kocok hingga bercampur
12. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C
13. Sentrifuge 2000 x g selama 5 menit pada suhu 2-8°C, setelah itu akan tampak pellet yang merupakan DNA dan phenol ethanol supernatant. Protein akan diisolasi dari supernatant tersebut

*Isolasi Protein**Protein precipitation*

14. Pindahkan phenol ethanol supernatant ke dalam dua epis baru / 1 ml *Trizol*
15. Masukkan 1500 μ l Isopropanol / 1 ml *Trizol*
16. Inkubasi 10 menit, 15-30°C
17. Sentrifuge 12000 x g selama 10 menit pada suhu 2-8°C

Protein Wash

18. Buang supernatant dan masukkan 0,3 M Guanidine HCl dalam ethanol 95% sebanyak 2000 μ l / 1 ml *Trizol*
19. Inkubasi 20 menit, 15-30°C
20. Sentrifuge 7500 x g selama 5 menit pada suhu 2-8°C
21. Lakukan langkah 18-20 sebanyak 3 kali
22. Setelah final wash, masukkan ethanol 2000 μ l / 1 ml *Trizol* kemudian vortex protein pellet.
23. Inkubasi 20 menit, 15-30°C
24. Sentrifuge 7500 x g selama 5 menit pada suhu 2-8°C
25. Masukkan ethanol 2000 μ l / 1 ml *Trizol* ke dalam epis
26. Simpan di dalam kulkas suhu -20°C hingga digunakan dalam tahap redissolving protein pellet

4.6.2.2 Ekstraksi Protein Sel Monolayer HSC-3 dan HSC-4

Tahap Homogenisasi

1. Buang medium di dalam *petri disc*
2. Masukkan 1000 μ l *Trizol* / 3,5 cm diameter *petri disc*. *Petri disc* yang digunakan berdiameter 9 cm sehingga dimasukkan 3000 μ l *Trizol*. Kekurangan *Trizol* akan menyebabkan kontaminasi dari isolated RNA dan DNA
3. Kerok sel menggunakan scraper kemudian pipetting hingga sel bercampur dengan *Trizol* lalu masukkan ke dalam 3 epis 1,5 ml
4. Inkubasi 5 menit, 15-30°C
5. Masukkan *chloroform* 200 μ l / 1 ml *Trizol*
6. Shake by hand 15 detik
7. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C
8. Sentrifuge 12000 x g selama 15 menit pada suhu 2-8°C
9. Setelah disentrifugasi akan tampak tiga lapisan di dalam epis, yaitu lower red, phenol *chloroform* phase (interphase) dan *colorless upper aqueous phase* (lapisan teratas yang bening). Buang lapisan *colorless upper aqueous phase* dengan pipet *eppendorf*.

Tahap-tahap *DNA precipitation* dan isolasi protein sama dengan langkah-langkah ekstraksi protein pada jaringan mukosa normal

4.6.3. *Bradford Protein Assay*

Setelah ekstraksi protein → Keringkan sampel protein yang masih dalam bentuk pellet di dalam ethanol 100%, setelah kering campurkan dengan 1% SDS. Inkubasi dalam suhu 50°C hingga sampel protein terlarut. Lakukan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10000g suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam epis baru.

Prosedur *Bradford Protein Assay*

1. Menyiapkan standard protein dengan pengenceran 8x (rentang konsentrasi 8-1024 μ g/ml)

2. Ambil protein standar BSA dengan konsentrasi 284000 $\mu\text{g/ml}$. Pengenceran dimulai dari konsentrasi tertinggi (1024 $\mu\text{g/ml}$) hingga mencapai konsentrasi terendah.
3. Sebagai cetakan pengenceran terakhir yang akan digunakan di 96 *well* (protein yang digunakan dalam bentuk pellet sehingga dilakukan pengenceran sebesar 100 kali)
4. Ambil 160 μl sampel protein (protein standar BSA dan sampel protein) ke dalam 96-*well plate* (duplo) dan tambahkan 40 μl larutan bradford ke dalamnya. Masukkan *well* ke dalam microplate reader, kemudian menggunakan perangkat lunak *microplate manager* konsentrasi protein total dibaca pada panjang gelombang 655nm.

4.6.4. SDS-PAGE

Alat:

1. *Centrifuge*
2. *Vortex*
3. Pipet *Eppendorf*
4. Timbangan
5. pH meter
6. Stirrer plate
7. Pipet
8. *Erlenmeyer*
9. *Becker glass*
10. Kaca pengaduk
11. Mortar and pestel
12. Epis 1,5 ml
13. *Tube* 15 ml
14. Pipet tips 1000 μL dan 200 μL
15. *Blade*
16. *Tissue Culture dish*
17. Timer
18. *Power pack*

Bahan:

1. Guanidine HCl 0,3 M
2. Etanol 100%
3. Isopropanol
4. *Chloroform*
5. *Trizol*
6. Tris Base
7. HCl 1 N
8. MiliQ H₂O
9. TEMED
10. *Ammonium Persulfat*
11. Aqua Bidestilata
12. Larutan Bradford
13. *Comassie Blue*
14. BSA (Bovine Serum Albumine)
15. PBS
16. 10% SDS
17. *Acrylamide-BisAcrylamide*
18. Marker protein *See Blue Protein Marker* (Invitrogen).

19. SDS-PAGE *Running Apparatus*
20. *Ice Box*
21. Keranjang sterilisasi
22. *Autoclave*
23. *Multichannel pippette*
24. *Microplate 96 well*
25. *Microplate manager software*
26. *Microplate reader*

Langkah Kerja SDS-PAGE

Pembuatan *Resolving Buffer Stock* dan *Stacking Buffer Stock*

1. 4x *Stacking Buffer Stock* 0,5 m Tris HCl (pH 6,8)
1 Molar larutan merupakan Berat molekul (dalam gram) dalam satu liter
2. 8x *Resolving Buffer Stock* 3 M Tris HCl (pH 8,8)

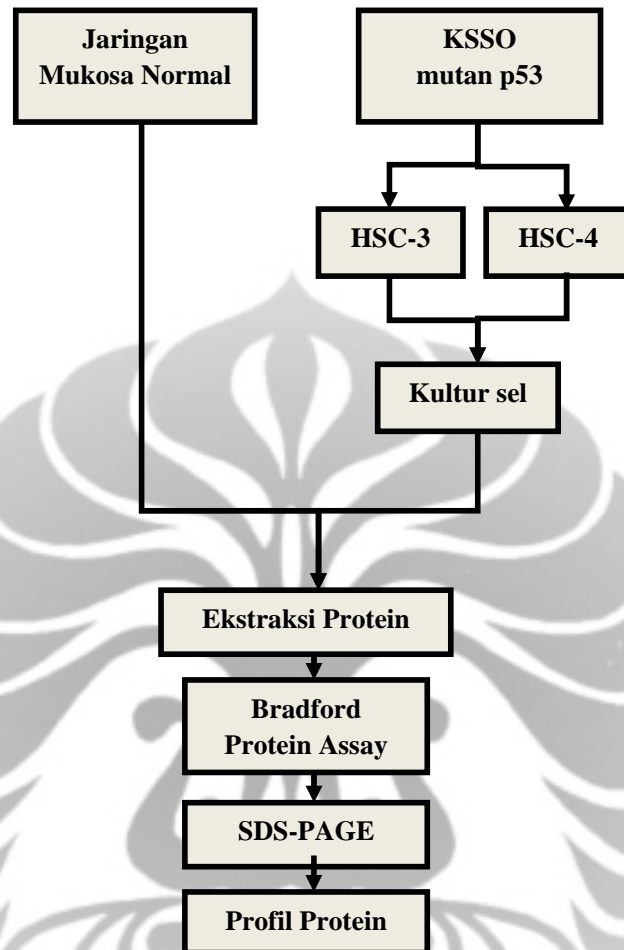
Tabel 4.1 Perbandingan komposisi *resolving* dan *stacking* dalam pembuatan SDS-PAGE

Bahan	<i>Resolving Buffer</i> (μL)	<i>Stacking Buffer</i> (μL)
MiliQ	4400	2385
<i>Acrylamide-bisacrylamide</i>	3750	375
<i>Resolving buffer</i>	1250	-
<i>Stacking Buffer</i>	-	1000
SDS 10%	100	40
APS 1,5 %	500	200
Jumlah	30	30

Prosedur SDS-PAGE

1. Persiapkan SDS apparatus
2. Masukkan resolving gel ke dalam gel cast 1,5 cm dari tepi atas menggunakan pipet Pasteur plastik
3. Tambahkan miliq hingga penuh
4. Tunggu hingga menjadi gel (gel yang tersisa di dalam *tube* dapat menjadi indikasi)
5. Keringkan air dengan menggunakan kertas penyerap
6. Campur stacking gel, isi hingga penuh, masukkan sisir
7. Ketika menunggu menjadi gel, panaskan thermal block hingga mencapai 100 °C
8. Campur sample buffer dan sample protein dengan perbandingan 2:1
9. Inkubasi 5 menit dalam 100 °C
10. Angkat sisir
11. Letakkan sample tracker yang berwarna kuning di atas gel cast
12. Masukkan 15µL sample protein menggunakan tips 10µL
13. Masukkan 8µL protein marker (*invitrogen SeeBluePlus2*)
14. Larikan pada 100V selama 30 menit
15. Larikan pada 200V selama 1 jam
16. Lepaskan gel
17. Bilas dengan menggunakan *comassie blue R-250* 0,05% sehingga tampak pita protein.
18. Destain dengan *destaining solution*

4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisa Data

Perbedaan profil protein pada sel galur HSC-3 dan HSC-4 serta jaringan mukosa normal dilihat dengan teknik SDS-PAGE dan diamati dengan program *Gel Doc*.

4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek penelitian drg. Yuniardini S Wimardhani, MscDent. dan telah memperoleh surat lolos etik penelitian FKG UI.