

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

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

4.2 Sampel Penelitian

Spesimen berupa jaringan gingiva berukuran 2x2x2 mm didapatkan dari pasien yang menjalani odontektomi di klinik Bedah Mulut FKG UI pada periode Mei-Juli 2008. Dua puluh tujuh spesimen kontrol dikumpulkan dan dianalisa dalam penelitian ini.

Sel galur KSSRM tipe HSC-3 dan HSC-4 didapatkan dari Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

4.3 Lokasi 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

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah sel galur KSSRM HSC-3, HSC-4 dan jaringan mukosa mulut normal.

4.4.2. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah profil protein hTERT

4.5. Definisi Operasional

4.5.1. Sel Galur HSC-3

Sel Galur HSC-3 adalah sel galur KSSRM dengan mutasi insersi 4bp pada kromosom 17p yang diekstraksi menggunakan kit Trizol Invitrogen untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.2. Sel Galur HSC-4

Sel Galur HSC-4 adalah sel galur KSSRM dengan mutasi *missense* pada kromosom 17p yang diekstraksi dengan menggunakan kit Trizol Invitrogen untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.3. Jaringan Mukosa Mulut Normal

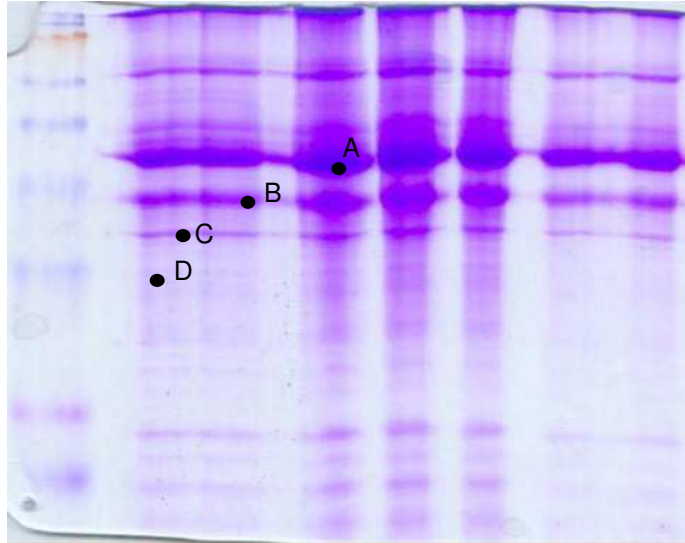
Jaringan mukosa mulut normal adalah jaringan gingiva sehat secara klinis serta tidak memiliki kelainan seperti kista atau tumor sebesar 2x2x2 mm yang didapat dari pasien yang menjalani odontektomi di klinik Bedah Mulut RSGM-P FKG UI pada periode Mei-Juli 2008 yang kemudian disimpan pada suhu -80° hingga waktu dilakukan ekstraksi protein menggunakan kit Trizol (Invitrogen) untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.4. Profil Protein hTERT

Profil protein hTERT adalah keberadaan pita protein dengan berat molekul 117-137 KDa yang nampak pada gel SDS-PAGE berdasarkan standar protein *ladder* invitrogen SeeBluePlus2 dengan pewarnaan Comassie Blue 0,05% dan dianalisa dengan program Quantity One BioRad.

4.5.5. Tingkat ekspresi hTERT

Tingkat ekspresi hTERT adalah ketebalan pita protein yang dinilai dengan visualisasi langsung secara intrapersonal dan interpersonal dengan penilaian antara 0 dan 4 (0= tidak terlihat, 1 tipis, 2 = sedang, 3 = tebal, 4 = sangat tebal). Gambar 4.1 menunjukkan parameter ketebalan pita protein yang digunakan dalam penelitian ini.



Gambar 4.1. Parameter ketebalan pita protein. (A) sangat tebal dengan skoring 4; (B) tebal dengan skoring 3; (C) sedang dengan skoring 2; (D) tipis dengan skoring 1. Skoring 0 digunakan untuk pita protein hTERT yang terdeteksi oleh program Quantity One.

4.6. Alat, Bahan, dan Cara Kerja

4.6.1. Alat

1. *Centrifuge* (Sorvall)
2. Pipet Eppendorf
3. *Stirrer plate* (Nouva)
4. Pipet pasteur
5. *Becker glass*
6. Tube Eppendorf
7. Tube 15 ml
8. Tube 50 ml
9. *Pipet tips* 1000 μ L dan 200 μ L
10. *Tissue Culture dish*
11. *Syringe* 50 ml (Terumo)
12. *Filter*
13. *Cell Scraper*
14. *Water bath* (CERTOMAT Biotech)
15. Inkubator (Inco2, Memert)
16. *Bio Safety Cabinet (Laminar flow)* (ESCO MicroPTE LTD)
17. *Liquid Nitrogen Cryopreservation* (Termolyne Bio CaneTM 20)

18. Mikroskop (Olympus)
19. *Aluminium foil*
20. *Vortexer* (BioRad)
21. Timbangan (OHAUS *explorer*)
22. pHmeter (Mettler Toledo)
23. Tabung Erlenmeyer
24. Kaca pengaduk
25. *Mortar dan pestle*
26. *Surgical Blade*
27. *Power pack*
28. SDS PAGE *Running Apparatus*
29. *Ice Box*
30. *Multichannel pippette*
31. *96-well microplate*
32. *Microplate reader* (Bio-Rad)
33. *Microplate manager software*
34. Gel Doc 2000 (Bio-Rad)
35. *Quantity One software*

4.6.2. Bahan

1. DMEM High Glucose L-Glutamine
2. FBS (Fetal Bovine Serum) 10%
3. Penstrap
4. Fungizone
5. PBS (Phosphate Buffer Saline)
6. Guanidine HCl 0,3 M
7. Etanol 100%
8. Isopropanol
9. Chloroform
10. Trizol
11. Tris Base
12. HCl 1N dan 2N
13. miliQ H₂O

14. TEMED
15. Ammonium Persulfat (APS) 1,5%
16. Aqua Bidestilata
17. Bradford reagent (Bio-Rad)
18. Standar protein (BSA: *Bovine Serum Albumine*) 284 mg/ml
19. *Sample Buffer* (BioRad)
20. PBS (*Phosphate Buffer Saline*)
21. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) 1% dan 10%
22. Acrylamide-BisAcrylamide
23. *Protein Marker* (Invitrogen SeeBluePlus2)
24. Comassie Blue R-250 0,05%
25. Destaining Solution (10% asam asetat, 10% ethanol di dalam akuades)

4.6.3 Cara Kerja

4.6.3.1 Persiapan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu *epis*, *aluminium foil*, *pipette tips*, PBS 10%, *mortal* dan *paste* disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 120°C. Sterilisasi juga menggunakan sinar UV, jika pengerjaan di dalam *laminar flow*.

b. Pengumpulan Jaringan Gingiva Sehat

Jaringan gingiva sehat yang di dapat dari klinik Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Indonesia dibungkus dengan menggunakan *aluminium foil* dan dimasukkan ke dalam *epis*. Jaringan gingiva sehat disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu -80°C sebelum dilakukan ekstraksi protein.

c. Pembuatan Medium Kultur Lengkap

Campur *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM) yang siap pakai dengan penstrap, fungizone dan PBS ke dalam *falcone*. Larutan ini kemudian disaring dengan

menggunakan syringe. Medium kultur lengkap disimpan di dalam lemari pendingin.

d. Pembuatan Protein Standar untuk Bradford Protein Assay

Protein standar BSA (BioRad) dengan konsentrasi 284 mg/ml dilarutkan hingga mencapai konsentrasi 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8µg/ml.

e. Pembuatan *Stacking* dan *Resolving Buffer Stock* untuk SDS-PAGE

Untuk membuat 4x *stacking gel buffer stock* 0,5 M Tris HCl dengan pH 6,8 sebanyak 100 ml, diperlukan Tris HCl sebanyak 6,06 g. Sedangkan untuk membuat 8x *resolving gel buffer stock* 3 M Tris HCl dengan pH 8,8 sebanyak 100 ml, Tris HCl yang dibutuhkan sebanyak 36,34 g. Tris HCl yang telah ditimbang dilarutkan di dalam miliQ *water* hingga terlarut dan sesuaikan pH dengan menambahkan larutan HCl hingga mencapai pH yang dibutuhkan.

4.6.3.2 Kultur Sel Galur HSC-3 dan HSC-4

Pengerjaan kultur sel galur HSC-3 dan HSC-4 dilakukan di dalam ruang laminar flow (biohazard cabinet) yang sebelumnya telah disterilisasi dengan ethanol dan sinar ultraviolet. Sel galur HSC-3 dan HSC-4 dikeluarkan dari cryopreservation (tabung nitrogen) dan dilakukan “*quick thaw*” hingga sel menjadi mencair. Sel galur dipindahkan kedalam tube 15ml yang telah berisi medium kultur lengkap, lalu lakukan pipetting untuk memisahkan sel-sel. Selanjutnya, sel galur disentrifugasi (90xg selama 5 menit) sehingga akan terbentuk pellet dan supernatant, supernatant dibuang sementara pellet yang merupakan endapan sel dipertahankan. Sel yang mengendap disebar di dalam cawan petri yang telah terisi medium kultur

lengkap. Sel kultur disimpan di dalam incubator dengan suhu 37°C dan mengandung CO₂ sebanyak 5%.

Satu kali dalam sehari, sel kultur dipantau dengan menggunakan mikroskop. Jika banyak sel galur yang mengambang, penggantian medium perlu untuk dilakukan untuk menjaga berlangsungnya kehidupan sel. Jika sel sudah *confluent*, sel dapat dipanen dan ekstraksi protein dapat dilakukan.

4.6.3.3 Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein dari sel HSC-3 dan HSC-4 dilakukan dengan Kit Trizol (Invitrogen) sesuai instruksi produk. *Pellet* protein yang disimpan di dalam ethanol 100% pada suhu -20°C.

Sebelum dilakukan analisis Bradford Protein Assay dan SDS-PAGE, protein dilarutkan. Sampel protein yang masih dalam bentuk *pellet* di dalam ethanol 100% dikeringkan hingga ethanol yang ada menguap. Setelah kering, *pellet* protein dicampurkan dengan 1% SDS. Inkubasi dalam suhu 50°C hingga sampel protein terlarut. Protein yang telah terlarut disentrifugasi selama 10 menit (10000xg, suhu 4°C). Supernatant yang dihasilkan dipindahkan ke dalam epis yang baru dan disimpan di dalam suhu -20°C.

4.6.3.4 Bradford Protein Assay

Protein yang telah dilarutkan diencerkan hingga 100 kali. Protein standar BSA dan sampel protein dimasukkan secara *duplo* ke dalam 96-well plate sebanyak μl dan tambahkan 40 μl larutan Bradford ke dalam masing-masing *well*. Selanjutnya 96-well plate yang telah terisi dimasukkan ke dalam *microplate reader* dan dibaca dengan *microplate manager* pada panjang gelombang 655nm. Data yang dihasilkan adalah konsentrasi protein total pada sampel.

4.6.3.5 SDS-PAGE

Sample Buffer dan sampel protein dicampur dengan perbandingan 2:1 dan diinkubasi dengan suhu 100°C selama 5 menit.

Untuk membuat *resolving gel*, campur miliQ *water* 4400 µl, Acrylamide-bisacrylamide 3750 µl, *Resolving buffer stock* 1250 µl, SDS 10% 100 µl, dan APS 1,5% 500 µl ke dalam *tube* 15ml. Pada saat operator siap memasukkan *gel* kedalam *gel cast*, masukkan TEMED sebanyak 15 µl. *Resolving gel* dimasukkan ke dalam *gel cast* hingga mencapai ketinggian 1,5 cm dari tepi atas *gel cast* menggunakan pipet pasteur. Apabila terdapat gelembung, tambahkan miliQ hingga gelembung pecah. Setelah *resolving gel* di dalam *gel cast* mengeras (hal ini diindikasikan dengan sisa *resolving gel* di dalam *tube* 15 ml yang mengeras), serap miliQ dengan menggunakan kertas penyerap.

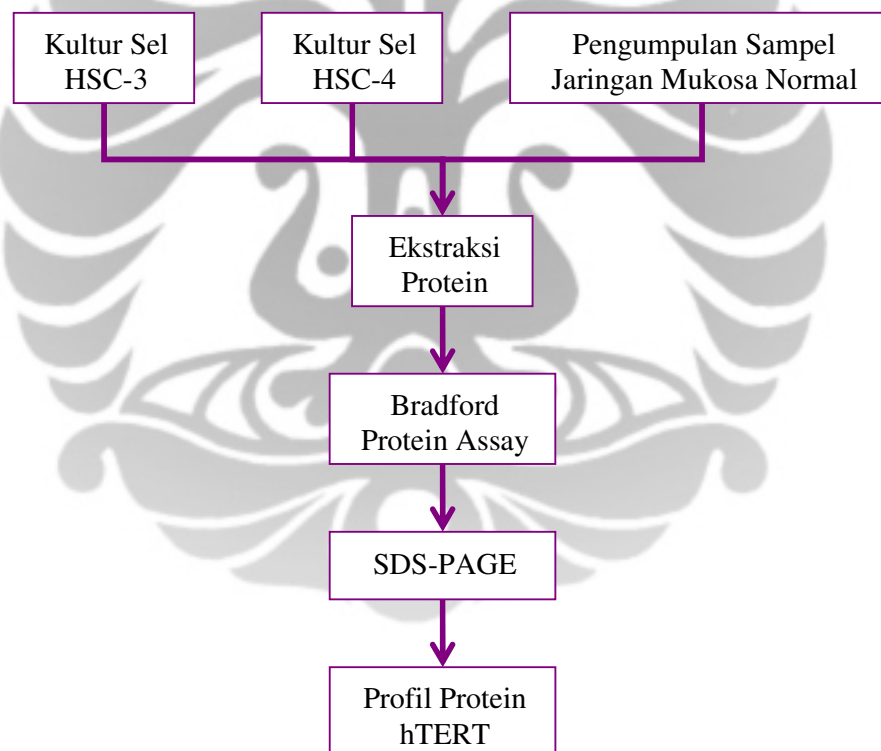
Cara pembuatan *stacking gel* serupa dengan pembuatan *resolving gel*, yang membedakannya adalah volume bahan-bahan dan jenis *buffer* yang digunakan. Untuk membuat *stacking gel*, dibutuhkan miliQ *water* 2385 µl, Acrylamide-bisacrylamide 375 µl, *stacking buffer stock* 1000 µl, SDS 10% 40 µl, APS 1,5% 200 µl dan TEMED sebanyak 15 µl. *Stacking gel* dimasukkan ke dalam *gel cast* hingga penuh dan masukkan sisir untuk membentuk sumur-sumur tempat dimasukkannya protein. Lepas sisir pada saat *stacking gel* telah mengeras.

Susun *gel cast* di dalam SDS-PAGE *apparatus* dan letakkan *sample tracker* yang berwarna kuning di atas *gel cast*. Sampel protein dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 15 µl menggunakan tips 10 µl. Sisakan satu sumur untuk menempatkan *protein marker* sebanyak 8 µl. *Protein marker* yang dipergunakan adalah invitrogen SeeBluePlus2 yang terdiri dari 10 protein yang dapat menjadi standar berat molekul dengan rentang antara 3 dan 188 kD yang diukur pada SDS-PAGE.

Gel dilarikan pada 100V selama 30 menit untuk mengumpulkan protein diatas *resolving gel*. Dan dilarikan pada 200V hingga protein standar 188 dan 98 kD terpisah cukup jauh dan tampak delapan *protein marker* (14 kD-188 kD). Gel yang telah dilarikan dilepas dari *gel cast* dan direndam dengan menggunakan comassie blue R-250 0,05 ml sehingga tampak pita protein. Supaya pita protein semakin terlihat kontras, lakukan penghilangan pewarnaan dengan *destaining solution*.

Selanjutnya, *gel* dimasukkan ke dalam Gel Doc 2000 dan dianalisis dengan menggunakan program BioRad Quantity One.

4.7. Alur Penelitian



4.8 Analisa Data

Perbedaan profil protein hTERT pada sel galur HSC-3, HSC-4 dan gingiva normal dilihat dengan teknik SDS-PAGE dan dianalisis dengan menggunakan program Quantity One.

4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Drg Yuniardini S. Wimardhani MScDent dan telah memperoleh surat lolos etik penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

