

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif *in vitro* pada spesimen gingiva normal dan sel galur kanker mulut yang dikultur di Laboratorium Biologi Oral FKG UI.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Spesimen gingiva berukuran 2x2x2 mm didapatkan dari pasien yang menjalani odontektomi di klinik Bedah Mulut RSGM-P FKG UI pada periode Mei-Juli 2008.

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

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

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

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut HSC-3 dan HSC-4 dan mukosa normal

4.4.2. Variabel Bebas

Profil protein p73

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 SeeBlue Plus2 (Invitrogen) dengan pewarnaan Comassie Blue R-250 0,05%.

4.5.2. Mukosa Normal

Jaringan gingiva sehat sebesar 2x2 mm yang didapat dari pasien yang menjalani odontektomi gigi M3 di klinik Bedah Mulut RSGM-P FKG UI periode Mei-Juli 2008 yang kemudian disimpan pada suhu -80° C hingga waktu ekstraksi protein menggunakan *Trizol reagent*.

4.5.3. Sel Galur HSC-3

Sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut dengan mutasi insersi p53, SNP 72P dan p53 (-) yang kemudian dikultur dan diekstrak proteinnya menggunakan *Trizol reagent* untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

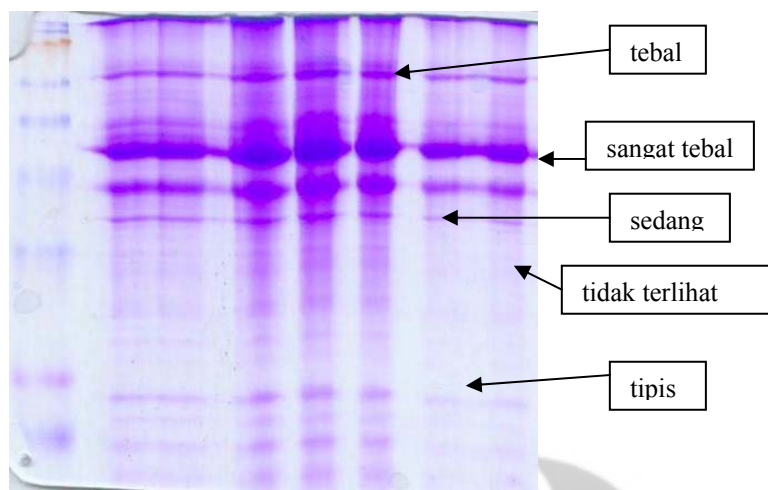
4.5.4. Sel Galur HSC-4

Sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut dengan mutasi missense p53, SNP 72R, p53 (+), yang kemudian dikultur dan diekstrak proteinnya menggunakan *Trizol reagent* untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

4.5.5. p73

Pita protein dengan berat molekul 70-80 kD yang nampak pada gel SDS PAGE berdasarkan standar protein SeeBlue Plus2 (Invitrogen) dengan pewarnaan Comassie Blue 0,05%.

4.5.6. Ketebalan pita protein



Pita protein sangat tebal adalah tingkat ketebalan pita protein yang sangat tinggi pada gel SDS PAGE seperti terlihat pada gambar.

Pita protein tebal adalah tingkat ketebalan pita protein yang tinggi pada gel SDS PAGE seperti terlihat pada gambar.

Pita protein sedang adalah tingkat ketebalan pita protein yang rendah pada gel SDS PAGE seperti terlihat pada gambar.

Pita protein tipis adalah tingkat ketebalan pita protein yang terendah pada gel SDS PAGE seperti terlihat pada gambar.

Pita protein tidak terlihat adalah tingkat ketebalan pita protein yang tidak terlihat mata pada gel SDS PAGE seperti terlihat pada gambar.

4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

4.6.1 Alat

1. Centrifuge (Sorvall)
2. Pipetor Eppendorf
3. Stirrer plate (Nouva)
4. Pipet pasteur
5. Tube Eppendorf
6. Tube 15 ml

7. Tube 50 ml
8. Pipet tips 1000 μ L dan 200 μ L
9. *Tissue Culture dish*
10. Syringe 50 ml (Terumo)
11. *Sartorius minisart single use syringe filter steril*
12. Cell Scraper
13. Inkubator (Inco 2, Memmert)
14. Mikroskop (Olympus)
15. Bio Safety Cabinet (ESCO MicroPTE LTD)
16. Liquid Nitrogen Cryopreservation (Termolyne Bio Cane™ 20)
17. Mortar dan Pestle
18. Timbangan OHAUS
19. *Surgical Blade*
20. Botol *Schott*
21. pH meter (Mettler Toledo)
22. *Power pack*
23. Vortexer (Bio Rad)
24. Thermal Block (O-Biotek)
25. SDS PAGE Running Apparatus (Bio Rad)
26. *Multichannel pippette* (Eppendorf)
27. Microplate 96 well
28. *Microplate reader* (Bio Rad) dan *microplate manager software*
29. Microplate reader
30. Gel Doc 2000

4.6.2 Bahan

1. Sampel gingiva yang disimpan dalam suhu -80° C
2. DMEM High Glucose L-Glutamine
3. FBS 10%
4. PenStrap
5. Fungizone
6. Trizol reagent

7. Chloroform
8. Etanol 100%
9. Ethanol 75%
10. Isopropanol
11. Guanidine HCl 0,3 M dalam 95% ethanol
12. Tris Base
13. HCl 1 N & 2 N
14. miliQ H₂O
15. TEMED
16. Ammonium Persulfate (APS) 1,5%
17. Larutan Bradford (Bio Rad)
18. Comassie Blue R250 0,05%
19. BSA (*Bovine Serum Albumine*) (Bio Rad)
20. PBS
21. SDS 10%
22. SDS 1%
23. Acrylamide-BisAcrylamide
24. SeeBlue Plus2 (Invitrogen) Protein Marker.

4.6.3 Cara Kerja

4.6.3.1 Persiapan

4.6.3.2 Pengambilan sampel mukosa mulut normal

Jaringan yang diambil adalah jaringan gingiva normal terbuang di daerah odontektomi serta tidak memiliki kelainan seperti adanya kista atau tumor. Sampel gingiva yang telah diperoleh langsung dilapisi dengan *aluminium foil*, dimasukkan ke epis, kemudian disimpan dalam *ice box* untuk disimpan lebih lanjut di dalam suhu -80°C hingga dilakukan tahap ekstraksi protein

4.6.3.3 Kultur sel galur kanker mulut

Kedua sel galur kanker mulut HSC-3 dan HSC-4 dikultur menggunakan DMEM high glucose L-Glutamine dengan 10% FBS dengan

antibiotic (PenStrap) dan antijamur (Fungizone), kemudian diinkubasi dalam suhu 37°C, 95% humiditas dengan 5 % CO².

4.6.3.4 Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein sampel sel galur HSC-3 dan HSC-4 serta jaringan mukosa normal dilakukan dengan Kit TRIzol (Invitrogen) sesuai dengan instruksi produk. Hasil ekstraksi protein disimpan pada suhu -20°C, sampai saat analisis SDS PAGE dilakukan.

4.6.3.4.1 Ekstraksi protein jaringan mukosa normal

Tahap Homogenisasi

1. Timbang jaringan menggunakan timbangan OHAUS explorer
2. Cacah jaringan dengan *surgical blade* di cawan petri yang dialasi dengan es
3. Tumbuk jaringan dengan *mortar* dan *pestle* hingga halus
4. Masukkan Trizol *reagent* 1ml per 50 mg jaringan lalu pindahkan ke dalam epis 1,5 ml
5. Inkubasi 5 menit, 15-30°C
6. Masukkan chloroform 200 µl / 1 ml Trizol
7. *Shake by hand* 15 detik
8. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C
9. Sentrifugasi 12000xg 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*.

Tahap DNA Precipitation

11. Tambahkan 300 µl ethanol 100% / 1 ml Trizol reagent ke dalam epis lalu kocok hingga bercampur
12. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C

13. Sentrifugasi 2000xg selama 5 menit pada suhu 2-8°C, setelah itu akan tampak pellet yang merupakan DNA dan *phenol ethanol supernatant*. Protein akan diisoli dari supernatan tersebut.

Isolasi Protein

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

Protein Wash

18. Buang supernatan dan masukkan 0,3 M Guanidine HCl dalam ethanol 95% sebanyak 2000 µl / 1 ml Trizol
19. Inkubasi 20 menit, 15-30°C
20. Sentrifugasi 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 µl / 1 ml Trizol kemudian vortex *protein pellet*.
23. Inkubasi 20 menit, 15-30°C
24. Sentrifugasi 7500 x g selama 5 menit pada suhu 2-8°C
25. Masukkan ethanol 2000 µl / 1 ml Trizol ke dalam epis
26. Simpan di dalam kulkas suhu -20°C hingga digunakan dalam tahap *redissolving protein pellet*

4.6.3.4.2 Ekstraksi protein sel galur HSC-3 dan HSC-4

Tahap Homogenisasi

1. Buang medium di dalam cawan petri
2. Masukkan 1000 µl Trizol *reagent*/ 3,5 cm diameter cawan petri. Cawan petri yang digunakan berdiameter 9 cm sehingga dimasukkan 3000 µl Trizol.
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. Kocok dengan tangan selama 15 detik
7. Inkubasi 2-3 menit, 15-30°C
8. Sentrifugasi 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

4.6.3.5 Bradford Protein Assay

Setelah ekstraksi protein, *vacuum dry* sampel protein yang masih dalam bentuk pellet 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

Konsentrasi protein dari sampel diukur dengan metode Bradford Protein Assay. Sebelumnya dibuat larutan protein standar menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumine*) konsentrasi 284000 μ g/ml dengan pengenceran 8 kali. Untuk protein sampel yang awalnya berbentuk pellet dilakukan pengenceran sebesar 100 kali. Ambil 160 μ l sampel protein (protein standar BSA dan sampel protein) ke dalam 96-well plate (duplo) dan tambahkan 40 μ l larutan Bradford ke dalamnya. Masukkan 96-well plate ke dalam *microplate reader*, kemudian menggunakan perangkat lunak *microplate manager*, konsentrasi protein total dibaca pada panjang gelombang 655nm.

4.6.3.6 SDS PAGE

Langkah Kerja SDS PAGE

1. Pembuatan 4x stok buffer pengumpul 0,5 M Tris HCl (pH 6,8) dan 8x stok buffer pemisah 3 M Tris HCl (pH 8,8)

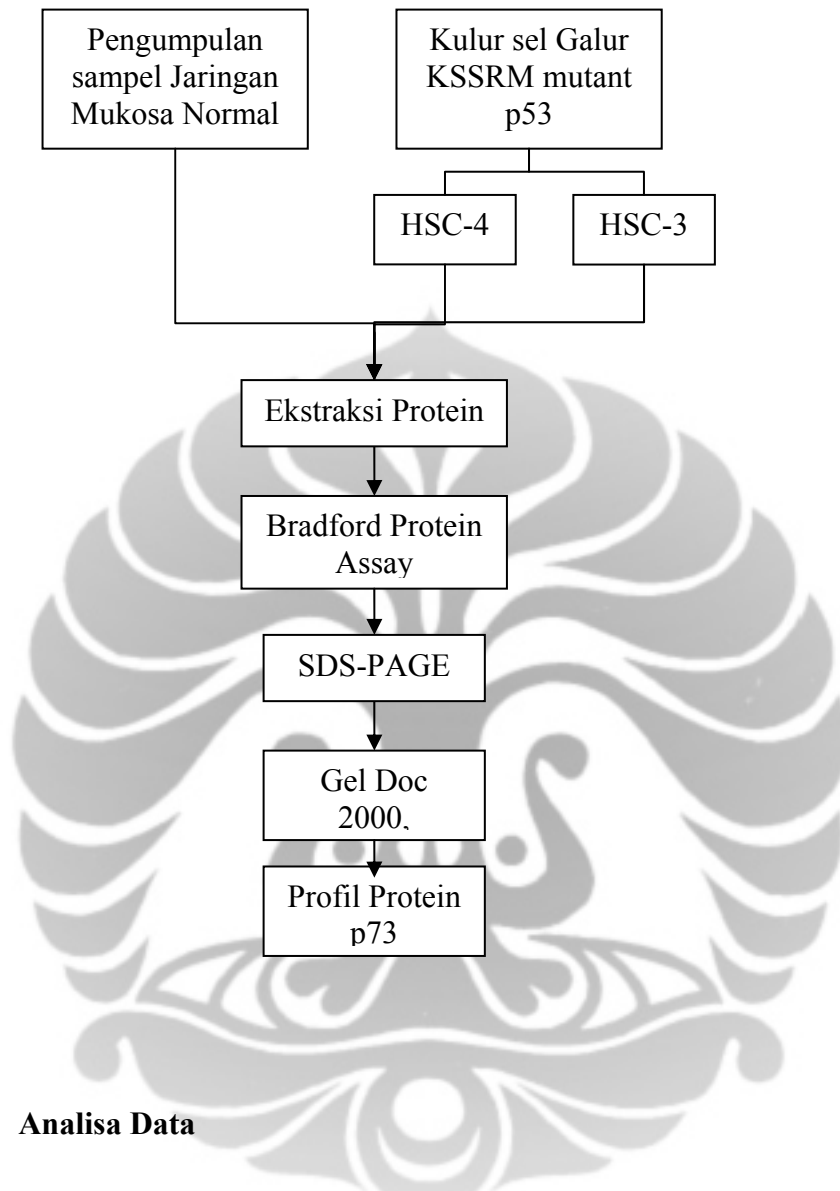
2. Pembuatan Gel SDS PAGE

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

Prosedur SDS-PAGE

1. Persiapkan SDS apparatus
2. Masukkan larutan gel pemisah ke dalam gel cast 1,5 cm dari tepi atas menggunakan pipet Pasteur, tunggu hingga gel mengeras
3. Buat gel pemisah, masukkan ke dalam *gel cast* hingga mencapai batas atas, masukkan sisir
4. Sementara menunggu gel mengeras, panaskan *thermal block* hingga mencapai 100°C
5. Campur sampel buffer dan sampel protein dengan perbandingan 2:1
6. Inkubasi sampel yang telah dicampur selama 5 menit dalam suhu 100°C
7. Angkat sisir dari *gel cast* yang telah dimasukkan gel pengumpul
8. Letakkan *gel cast* di SDS Apparatus,
9. Letakkan *sample tracker* di atas gel cast
10. Masukkan $15\mu\text{L}$ sample protein dan $8\mu\text{L}$ protein marker (Invitrogen SeeBluePlus2) menggunakan tips $10\mu\text{L}$ ke *sample tracker* sesuai dengan lajunya masing-masing
11. Larikan gel pada tegangan 100V selama 30 menit yang kemudian lanjutkan pada 200V selama 1 jam hingga standar protein telah turun mencapai ujung gel.
12. Lepaskan gel dari SDS Apparatus
13. Warnai dengan menggunakan Comassie Blue R-250 0,05% sehingga tampak pita protein.
14. *Destain* gel yang telah diwarnai dengan *destaining solution*

4.7 Alur Penelitian



4.8 Analisa Data

Profil protein p73 pada mukosa mulut normal, sel galur HSC-3 dan HSC-4 dilihat dengan teknik SDS PAGE dan diamati dengan program Quantity One

4.9 Etik Penelitian

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian Drg Yuniardini S. Wimardhani MSc Dent dan telah memperoleh surat lolos etik penelitian FKG UI.

