



**USULAN PROGRAM KEGIATAN MAHASISWA  
ANTIBODI E6 SEBAGAI AGEN TERAPI KANKER LEHER RAHIM :  
PENDEKATAN SECARA IMMUNOMULEKULAR**

**BIDANG KEGIATAN :**

**PKM – PENELITIAN**

Diusulkan oleh :

Furqan Hidayatullah	105070100111090	2010
Cakra Parindra	115070107121010	2011
Verina Setyabudhi	125070100111025	2012
Sayyida Kamila Zaini	125070100111011	2012

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2013**

b. Halaman Pengesahan Laporan Kemajuan PKM-P

PENGESAHAN PKMP

1. Judul Kegiatan : Efek Antibodi Telomerase Sebagai Agen Terapi Kanker  
Leher Rahim: Pendekatan Secara Biomolekuler
2. Bidang Kegiatan : PKM-P
3. Ketua Pelaksana Kegiatan
  - a. Nama Lengkap : Furqan Hidayatullah
  - b. NIM : 105070100111090
  - c. Jurusan : Pendidikan Dokter
  - d. Universitas : Universitas Brawijaya
  - e. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Jl. Sigura gura gang IV no 215 B  
085260905586
  - f. Alamat email : [biomol\\_furqan@yahoo.com](mailto:biomol_furqan@yahoo.com)
4. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis : 3 (Tiga) orang
5. Dosen Pendamping
  - a. Nama Lengkap dan Gelar : Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS
  - b. NIP : 1950 0525 198002 1 001
  - c. Alamat Rumah dan No Tel./HP : Jl. Areng-areng Timur No. 07 Batu  
HP. 0811365240
6. Biaya Kegiatan Total
  - a. Dikti : Rp. 11.750.000,00
7. Jangka Waktu Pelaksanaan : 3 Bulan

Malang, 26 Juni 2014

Menyetujui  
Pembantu Dekan III FKUB



(dr. Bambang Prijadi, MS)  
NIP/NIK. 19520324 198403 1 002

Ketua Pelaksana Kegiatan



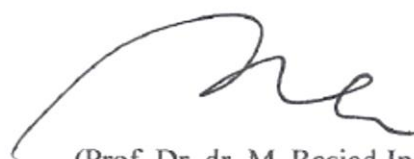
(Furqan Hidayatullah)  
NIM.105070100111090

Pembantu Rektor III  
Universitas Brawijaya



(H. R. D. Anurassyid, MS)  
NIP/NIK. 19550618 198103 1 002

Dosen Pendamping



(Prof. Dr. dr. M. Rasjad Indra, MS)  
NIP/NIK. 1950 0525 198002 1 001

## DAFTAR ISI

<b>a. HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>b. HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>c. DAFTAR ISI</b> .....	iii
<b>d. RINGKASAN</b> .....	v
<b>e. BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 LATAR BELAKANG.....	1
1.2 PERUMUSAN MASALAH.....	2
1.3 TUJUAN PENELITIAN.....	2
<b>f. BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Definisi dan Patogenesis Kanker Leher Rahim .....	4
2.2 Terapi Kanker Leher Rahim.....	4
2.3 Protein E6.....	5
2.4 Protein Telomerase.....	5
2.4 Antibodi E6.....	6
<b>g. BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	8
3.1 Produksi antibodi telomerase.....	8
3.2 Purifikasi dan pendeteksian antibodi telomerase.....	8
3.3 Kultur Sel HeLa.....	9
3.4 Definisi Operasional.....	7
3.5 Perlakuan antibodi E6.....	9
3.6 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data.....	10
<b>h. BAB 4. HASIL YANG TELAH DICAPAI</b> .....	11
4.1 Produksi Antibodi Telomerase.....	11
4.2 Purifikasi Antibodi Telomerase.....	11

4.3 Profilling protein dan Pendeteksian antibodi.....	11
4.4 ELISA.....	11
4.5 Kultur Sel.....	12
4.6 Ketercapaian target.....	13
<b>. BAB 5. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....</b>	<b>15</b>
5.1 Immunositokimia.....	15
5.2 Pengukuran Jumlah sel yang Hidup dengan MTT assay.....	15
3.3 Analisa Statistik.....	15
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>16</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>17</b>
<b>Rekapitulasi Penggunaan Dana .....</b>	<b>17</b>
<b>Dokumentasi Penelitian.....</b>	<b>17</b>

## RINGKASAN

Kanker leher rahim atau kanker serviks merupakan penyakit penyebab kematian akibat keganasan nomor satu di Indonesia. Kanker serviks memiliki kemampuan untuk berproliferasi secara terus menerus dan *immortal*. Tingginya proliferasi dan sifatnya yang tidak bisa mati, menyebabkan sel kanker mampu mengganggu berbagai reaksi sistemik pada tubuh penderitanya yang sering kali berujung pada kematian. Hingga saat ini belum ditemukan pengobatan yang adekuat untuk mengobati kanker. Infeksi HPV (*Human papilloma virus*) diketahui sebagai penyebab absolut dari kanker serviks, HPV yang menyerang sel skuamosa pada serviks menyebabkan peningkatan ekspresi protein E6. Protein E6 selanjutnya akan meregulasi ekspresi dari beberapa gen yang mengakibatkan terjadinya penurunan aktifitas dari protein p53 dan meningkatkan aktifitas dari hTERT telomerase sel. Regulasi yang ditimbulkan oleh protein E6 inilah yang menjadi dasar sel kanker dapat terus menerus berproliferasi dan *immortal*. Apabila regulasi E6 dapat ditekan maka sifat-sifat patologis sel kanker diyakini akan menghilang, sehingga pembelahannya dapat dihambat dan diinduksi kematiannya.

Tujuan dan target penelitian ini adalah untuk menghambat regulasi protein E6 menggunakan antibodi spesifik (antibodi E6) dan mengetahui dosis optimum antibodi E6 dalam menginduksi kematian dan penurunan aktifitas telomerase pada sel kanker serviks (HeLa *cell line*). Antibodi telomerase dihasilkan menggunakan vektor kelinci jantan sebanyak 2 ekor usia 12-16 minggu dengan cara menginjeksikan emulgel (antigen telomerase yang dikombinasikan dengan *freud adjuvant*) secara *intramuscular*. Penginjeksian dilakukan pada minggu pertama, ketiga, dan kedelapan. Penginjeksian antigen akan menginduksi kelinci untuk menghasilkan respon immunitas berupa antibodi *polyclonal*. Panen antibodi dilakukan dengan cara mengambil darah kelinci melalui vena *auricularis* pada minggu ketiga hingga minggu ke duabelas. Darah kelinci selanjutnya diisolasi hingga didapatkan serumnya, selanjutnya dipurifikasi untuk mendapatkan konsentrat igG *polyclonal* menggunakan metode SAS 50. *Western blotting* digunakan untuk mendeteksi keberadaan ikatan antara antibodi telomerase dan protein telomerase secara kualitatif, sedangkan metode ELISA digunakan sebagai pendeteksian secara kuantitatif. Antibodi E6 didapatkan dari Abcam, Antibodi E6 yang dihasilkan dikonjugasikan menggunakan Ab-deliverIN untuk membentuk kompleks yang mampu mengantarkan antibodi E6 kedalam sel kanker serviks (HeLa *cell line*) dan berikatan dengan protein E6. Ikatan yang dihasilkan antara antibodi E6 terhadap protein E6 pada sel HeLa diamati secara objektif menggunakan metode immunositokimia. Metabolit hasil pernafasan dan tren penurunan proliferasi sel HeLa yang terganggu akibat adanya ikatan

yang dihasilkan oleh antibodi E6 dan antibodi telomerase akan diobservasi menggunakan metode MTT *assay*. Antibodi E6 dipaparkan dengan dosis yang berbeda untuk mendapatkan dosis optimum antibodi dalam menginduksi penurunan proliferasi dan kematian sel HeLa pada MTT *assay*, dosis antibodi yang diujicobakan adalah 0  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , dan 2  $\mu\text{g}$ . Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan dan dipatenkan sebagai langkah awal dalam terapi kanker serviks dengan efek samping yang minimal pada sel normal

## BAB 1. Pendahuluan

### 1.1 Latar belakang

Kanker merupakan sekumpulan sel yang mampu membelah terus menerus dan *immortal*. Sel kanker awalnya merupakan sel normal yang berubah fungsi karena adanya mutasi genetik yang diakibatkan berbagai zat karsinogenik (*Central disease centre, 2012*). Sel kanker memiliki keunikan dalam pembelahannya yaitu peroliferasinya yang sangat tinggi dan tidak memiliki *anchorage dependent* (faktor penting dalam pembelahan sel) (Campbell *et al.*, 2010). Kemampuan berproliferasi tanpa limitasi yang dimiliki sel kanker tidak diimbangi oleh ketersediaan komponen sel untuk membentuk sel-sel baru yang normal, akibatnya sel kanker memiliki fungsi yang tidak normal dan mengganggu fungsi sel normal lainnya. Sel kanker mampu bermigrasi jauh dari tempat asalnya untuk “menularkan” sifat patologisnya pada jaringan yang sehat (Robbins *et al.*, 2002).

Kanker leher rahim atau kanker serviks merupakan kanker pembunuh nomor dua di dunia setelah kanker payudara, namun merupakan kanker pembunuh nomor satu di Indonesia dengan persentase sekitar 25,91% dari seluruh kanker (National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, 2010). Kejadian kanker serviks di seluruh dunia meningkat dari 378.000 kasus per tahun pada tahun 1980 menjadi 454.000 kasus per tahun pada tahun 2010 (tingkat kejadian tiap tahun meningkat 0,6%). Bahkan, tingkat kematiannya semakin tinggi, merenggut nyawa setiap jam di Indonesia atau setiap dua menit di dunia. Rata-rata kematian penderita kanker serviks mencapai 270 ribu orang tiap tahun. Saat ini sekitar 500 ribu orang wanita di seluruh dunia didiagnosa mengidap kanker serviks (PR Pakpahan, 2012). Angka kematian yang terjadi pada negara berkembang pada tahun 2010 adalah 200.000 jiwa, 46.000 diantaranya berusia 15-49 tahun dan 106.000 diantaranya berusia 50 tahun ke atas (Forouzanfar MH *et al.*, 2011)

HPV (human papilloma virus) diketahui sebagai penyebab absolut dari kanker serviks. HPV merupakan virus yang mampu untuk menginvasi sel *squamous* yang terdapat pada serviks manusia. Terdapat dua tipe HPV yang menyerang sel *squamous* manusia, yaitu *high risk* HPV dan *low risk* HPV. *High risk* HPV terutama tipe 16 dan 18 merupakan agen penginfeksi utama pada kanker serviks. *High-risk* HPV yang menginfeksi serviks akan mengekspresikan protein E6, protein ini mampu menonaktifkan protein P53 yang merupakan protein penghambat mitosis sel normal dan juga meningkatkan ekspresi hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) yang memiliki fungsi *immortalization* (Munger *et al.*, 2004). Kombinasi dari regulasi protein p53 dan hTERT oleh protein E6 pada kanker serviks

merupakan penyebab kanker serviks sulit disembuhkan. Pengobatan kanker serviks yang ada secara konvensional belum memberikan hasil yang memuaskan, seperti radioterapi dan kemoterapi sering kali memberikan efek samping yang besar pada sel-sel normal tubuh, ataupun terapi pembedahan sering kali memberikan pilihan yang radikal seperti pembedahan seluruh organ genitalia (Cohen *et al.*, 2009). Perkembangan terapi kanker saat ini mengarah pada penggunaan antibodi seperti VEGF, HER, ER pada kanker payudara yang terbukti lebih efektif dalam pengobatan kanker dan memberikan efek samping yang minimal pada sel normal.

Antibodi E6 mampu mengenali secara spesifik protein E6 diyakini mampu menekan ekspresi protein E6, yang mengakibatkan penurunan proliferasi sel melalui penurunan aktifitas telomerase dan penginduksian kematian sel kanker serviks. Peningkatan protein E6 hanya terjadi pada sel serviks yang terinfeksi HPV sehingga antibodi E6 hanya akan mengenali dan menyerang sel kanker dan tidak mengenali sel normal. Harapannya, terapi kanker leher rahim menggunakan antibodi E6 dapat digunakan sebagai alternatif terapi kanker serviks yang adekuat dan memiliki efek samping yang minimal pada sel normal.

## **1.2 Perumusan Masalah**

- 1.2.1 Apakah pemberian Antibodi E6 pada kanker serviks mampu menginduksi kematian sel kanker serviks manusia pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell line*) ?
- 1.2.2 Bagaimanakah pengaruh pemberian dosis antibodi E6 yang berbeda terhadap tingkat proliferasi sel kanker serviks manusia pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell Line*) ?
- 1.2.3 Bagaimanakah pengaruh pemberian dosis antibodi E6 yang berbeda terhadap tingkat aktifitas dari protein telomerase pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell Line*) ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### Umum

Memperoleh bukti bahwa antibodi E6 mampu menginduksi kematian sel kanker serviks manusia pada kultur sel kanker serviks (*HeLa cell line*) sehingga dapat diaplikasikan sebagai agen terapi kanker serviks.

### Khusus



- A. Memperoleh bukti bahwa antibodi E6 mampu menurunkan proliferasi sel kanker serviks melalui ikatan spesifik antibodi-antigen E6 yang terdapat pada kultur sel kanker serviks manusia (*hela cell lines*),
- B. Mengetahui konsentrasi optimal antibodi E6 dalam menginduksi kematian kanker serviks melalui pengamatan metabolit sel kanker serviks pada kultur sel kanker serviks (*hela cell line*) setelah terpapar antibodi E6.
- C. Mengetahui konsentrasi optimal antibodi E6 dalam menginduksi penurunan aktifitas telomerase melalui pengamatan immunositokimia kanker serviks pada kultur sel kanker serviks (*hela cell line*) setelah terpapar antibodi E6.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### **2.1 Definisi Dan Patogenesis Kanker Leher Rahim**

Serviks merupakan daerah yang terletak antara rahim dan vagina, sel skuamosa dan transisional sangat umum ditemukan pada daerah ini. Kanker serviks sering terjadi pada daerah peralihan antara ektoserviks dan endoserviks dimana banyak terdapat sel skuamosa. *Adenocarcinoma* dan *squamous cell carcinoma* merupakan gambaran yang lazim ditemukan pada kanker serviks, namun *squamous cell carcinoma* terdapat pada lebih dari 80% lesi kanker serviks (*American Cancer Society*, 2013). Pada stadium dini, kanker serviks tidak menimbulkan gejala, sehingga mayoritas diagnosa kanker serviks baru ditegakan saat kanker telah memasuki stadium lanjut. Eradikasi kanker serviks pada stadium lanjut sangat sulit dan menimbulkan efek samping yang besar pada sel normal, selain itu kanker serviks stadium lanjut mampu bermetastase ke jaringan-jaringan normal yang sering kali menyebabkan kematian.

Human papilloma virus (HPV) diketahui sebagai penyebab absolute dari kanker serviks, kemampuan HPV dalam menginvasi sel skuamosa pada serviks mengakibatkan terjadinya peningkatan proliferasi dan perubahan sikap menjadi *immortal* pada sel skuamosa. Peningkatan proliferasi sel yang terjadi akan menimbulkan defek fungsional dalam pembelahan sel dan mengakibatkan timbulnya gejala klinis berupa *dysplasia*. *Dysplasia* yang berlanjut akan menginduksi berbagai *pathway* hingga berujung pada terbentuknya kanker serviks (Hahn *et al.*, 2002). Sifat kanker yang sangat invasif dan agresif memungkinkan terjadinya metastase atau perpindahan sel kanker ke jaringan-jaringan normal, akibatnya terjadi kerusakan secara sistemik seluruh regulasi yang ada pada tubuh penderitanya dan sering kali berujung pada kematian.

### **2.2 Terapi Kanker Leher Rahim**

Menurut Cohen, 2009 terapi yang sering digunakan meliputi:

- A. Pembedahan : Pembedahan pada beberapa kasus merupakan pendekatan pertama untuk terapi kanker leher rahim.
- B. Kemoterapi : Merupakan terapi sistemik dengan menggunakan bahan kimia untuk menghentikan pertumbuhan sel kanker. Meskipun secara umum sangat efektif, akan tetapi dapat memberikan efek samping yaitu menurunnya jumlah leukosit, eritrosit dan trombosit mual, muntah, kelelahan, dan kebotakan.
- C. Radioterapi : Pada terapi radiasi, pasien mendapatkan sejumlah radiasi energi tinggi untuk merusak pembelahan sel kanker. Selain menghentikan pertumbuhan sel, radiasi

juga meminimalkan kerusakan pada sel yang sehat. Terapi dapat diberikan sendiri atau bersamaan dengan kemoterapi yang bertujuan mengurangi kekambuhan kanker.

### **2.3 Protein E6**

Protein E6 merupakan salah satu kunci keberhasilan sel kanker dalam menginvasi jaringan serviks. Perubahan *fenotipe* dan kemampuan yang terjadi pada kanker serviks disebabkan oleh adanya *maintenance* dari protein E6. Dua gen yang berperan penting dalam siklus hidup sel kanker adalah protein p53 dan protein telomerase. *High risk* HPV yang menginfeksi sel skuamosa normal diketahui mengekspresikan protein E6, Protein E6 yang diekspresikan oleh *high risk* HPV memiliki kemampuan untuk menghambat ekspresi protein p53 dan meningkatkan ekspresi protein hTERT telomerase. Protein p53 merupakan protein yang mengatur waktu proliferasi sel normal, apabila terdapat cukup sumber daya untuk bermitosis maka protein p53 akan menginduksi protein *Cdk* untuk memulai proses mitosis. Protein p53 akan memastikan bahwa sel yang bermitosis akan menghasilkan sel baru yang fungsional (Gewin *et al.*, 2001). Telomerase terdiri dari 2 komponen yaitu RNA hTR dan rantai katalitik hTERT. Telomerase berfungsi sebagai pelindung ujung DNA setiap kali siklus sel terjadi, normalnya telomerase tidak terekspresi pada sel normal, sehingga sel normal manusia mengalami kematian yang terkontrol sesuai dengan *Hayflick-Phenomen*.

Penekanan ekspresi protein p53 oleh protein E6 akan mengakibatkan berubahnya keseimbangan siklus sel, sehingga sel akan mempercepat waktu bermitosis dan sering kali pembelahannya menghasilkan sel yang patologis (Thorland *et al.*, 2003). Peningkatan ekspresi hTERT telomerase oleh protein E6 mengakibatkan aktifnya fungsi protektif pada pembelahan sel, perlindungan ini mengakibatkan sel kanker mampu terus membelah tidak akan pernah mengalami kematian atau *immortal*. Kemampuan E6 dalam meregulasi berbagai protein tersebut merupakan penyebab kanker leher rahim sangat sulit untuk dihentikan dan memiliki angka kematian yang sangat tinggi

### **2.4 Protein Telomerase**

Peraih *Prize Nobel of Medicine* 2009, Elizabeth Blackburn dari *University of California*, Carol Greider dari *Johns Hopkins University School of Medicine* dan Jack Szostak dari *Harvard Medical School*, berhasil mengidentifikasi bahwa enzim telomerase berperan dalam memperpanjang telomer sebagai bentuk protektif terhadap proses pemendekan telomer yang terjadi tiap pembelahan. Telomerase merupakan sebuah *reverse*

*transcriptase* yang membawa molekul RNA-nya sendiri, yang digunakan sebagai cetakan ketika telomerase memperpanjang telomer yang semakin pendek tiap kali terjadi siklus replikasi DNA. Telomerase memiliki 2 komponen utama, yaitu subunit katalitik (hTERT) dan RNA *template* (hTR). Melalui aktivasi telomerase, sel menjadi *immortal*, dimana kromosomnya tak akan memendek ataupun menjadi tidak stabil, meskipun sel tersebut telah membelah berulang-ulang (Cohen *et al.*, 2007).

Sel kanker dianggap '*immortal*' karena aktivitas telomerase memungkinkan sel kanker membelah secara virtual selamanya. Saat telomerase teraktivasi, tak terjadi lagi proses kematian sel akibat kromosom yang hilang ataupun tidak stabil. Selain itu, tidak terdapat lagi jalur penginduksi apoptosis sel. Telomerase teraktivasi pada hampir 90% kanker manusia, menunjukkan bahwa telomerase berperan penting dalam perkembangan sel kanker. Peran lain dari telomerase ialah meningkatkan regulasi 70 gen yang berhubungan dengan perkembangan dan penyebaran kanker ke seluruh tubuh. Telomerase mengaktivasi glikolisis, yang memungkinkan sel kanker menggunakan glukosa secara cepat untuk memfasilitasi peningkatan pertumbuhan sel kanker (Cohen *et al.*, 2007). Kanker serviks ternyata memiliki aktivitas telomerase hingga 95%, artinya immortalitas dan tingkat pembelahan sel kanker serviks sangat tinggi. Akibatnya, penderita kanker serviks sulit disembuhkan dan seringkali berujung pada kematian (Catarino *et al.*, 2010).

## **2.5 Antibodi E6**

Keberadaan reseptor sel kanker sering kali membingungkan sistem imun tubuh, *fenotipe* reseptor sel kanker dapat memiliki bentuk yang normal walaupun secara fungsional dan *genotipe* terdapat kerusakan. Salah satu perbedaan antara sel kanker dan sel normal adalah ekspresi protein yang dimiliki sel kanker. Antibodi merupakan suatu protein yang mampu mengenali secara spesifik komponen yang ingin ditujunya. Antibodi hanya akan berikatan dengan antigenya dan akan mengganggu fungsi dari antigen tersebut (Abbas *et al.*, 2007 ). Kanker serviks mengekspresikan protein E6 dalam jumlah besar, protein E6 hanya terdapat pada sel kanker namun tidak terdapat pada sel normal. Antibodi terhadap protein E6 mampu berikatan dan mengganggu kerja dari protein E6 secara spesifik sangat mungkin untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif pengobatan kanker serviks. Penurunan fungsional E6 karena adanya ikatan yang terjadi antara antibodi-antigen E6 akan mengakibatkan inaktivasi regulasi protein E6 terhadap protein p53 dan hTERT telomerase, sehingga kedua protein tersebut dapat kembali normal. Perubahan regulasi yang terjadi pada

protein p53 dan hTERT telomerase tersebut diharapkan mampu mengendalikan pertumbuhan dan menginduksi kematian sel kanker serviks karena kembalinya regulasi normal pada kanker serviks (Thorland *et al.*, 2003). Mengingat Protein E6 terdapat hanya pada sel kanker dan antibodi hanya mengenali secara spesifik protein E6, maka antibodi hanya akan menyerang sel kanker serviks dan tidak akan menyerang sel normal, hal ini akan memberikan efek samping yang minimal pada sel tubuh normal.

## BAB III METODE PENELITIAN

### **3.1 Produksi Antibodi telomerase**

Antibodi telomerase dihasilkan dengan cara meninjeksikan antigen protein telomerase kedalam tubuh kelinci jantan berusia 14-16 minggu secara intra muscular. Respon imunitas tubuh kelinci terhadap antigen yang disuntikan akan merangsang pembentukan antibodi igG pada tubuh kelinci. 200 $\mu$ L protein telomerase yang telah disediakan selanjutnya diencerkan (1 mg/mL) pada Tris-Cl lalu diemusikan dengan *Freud adjuvant* dengan konsentrasi 1:1 dan diinjeksikan secara intramuscular pada tubuh kelinci pada minggu pertama, ketiga, dan minggu ke delapan pasca perlakuan. Antibodi yang dihasilkan pada tubuh kelinci dipanen melalui darah pada *vena auricularis* menggunakan spuit 3cc dan *vacutainer heparin* untuk dilakukan penumpulan serum darah kelinci. pengambilan darah dilakukan pada minggu sebelum perlakuan sebagai kontrol, minggu pertama hingga minggu kesepuluh pada setiap minggunya. Serum yang terkumpul dianalisis menggunakan *Western blotting* dan ELISA (Florida State University, 2007):

### **3.2 Purifikasi dan Pendeteksian Antibodi telomerase**

Purifikasi dilakukan pada serum yang dikumpulkan untuk menghasilkan igG murni, purifikasi menggunakan metode SAS 50 (*saturated ammonium sulfate* 50). Setelah didapatkan konsentrat antibodi igG poliklonal selanjutnya dilakukan *Western blotting* untuk melihat ikatan antibodi secara kualitatif dengan metode (abcam, 2010): *Running* antigen pada SDS PAGE lalu transfer protein pada kertas nitroselulosa. Untuk memastikan antigen telah tertransfer pada nitroselulosa, rendam kertas nitroselulosa pada ponceau 1% dan bilas dengan skim milk 5% lalu cuci dengan TBS *tween* 0,05%. Lanjutkan dengan inkubasi menggunakan biotin sebagai antibodi sekunder, lalu inkubasikan menggunakan substrat TMB. Adanya pita menunjukkan terbentuknya ikatan spesifik antigen-antibodi telomerase.

*indirect ELISA (Enzyme Link Immuno Sorbent Assay)* digunakan untuk melihat immunogenitas dari protein telomerase. Secara detail, metodenya: serum kelinci yang terkumpul diencerkan dengan *Assay buffer* dengan perbandingan 1:10. Hasil kemudian di inkubasikan semalam dalam suhu 4 °C pada *microplate ELISA*, lalu cuci dengan PBS-Tween sebanyak 3 kali @5 menit. Tambahkan 50 $\mu$ L *blocking buffer*. Reagen dicuci dengan PBS-Tween selama 3 kali @5 menit. Inkubasi dengan 100 $\mu$ l antibodi primer (anti-E6) dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder

dalam *Tris Buffer Saline* 1:2500 dan diinkubasi 90 menit. Biotin digunakan sebagai antibodi sekunder, lalu TMB digunakan sebagai substrat. Hasil yang didapatkan dibaca pada ELISA reader dengan  $\lambda$  405 nm.

### 3.3 Kultur Sel HeLa

Sel HeLa dipanen dengan Tripsin-EDTA, lalu disentrifugasi selama 8 menit pada 1500 rpm, pelet yang didapatkan dikultur pada MEM yang sudah ditambahkan serum. Sel ditanam pada well dan diinkubasi 37<sup>0</sup>C, 95% udara, 5% CO<sub>2</sub>, 100% kelembapan

### 3.4 Perlakuan Antibodi E6 dan telomerase pada Kultur HeLa melalui immunositokimia dan MTT assay

Untuk menkonjugasikan antibodi agar dapat menembus inti sel HeLa, reagen Ab-DeliverIN digunakan pada penelitian ini. Penggunaan Ab-DeliverIN menggunakan protokol resmi Ab-DeliverIN

Tissue Culture Dish	Antibody Quantity ( $\mu$ g)	Ab-DeliverIN™ ( $\mu$ L)	Dilution Volume ( $\mu$ L)	Total Medium Volume
96 well	0.4	0.4	20	120 $\mu$ L
24 well	1	2	100	500 $\mu$ L
12 well	2	4	100	1 mL
6 well	5	10	200	2 mL
60 mm dish	10	20	200	4 mL
90 - 100 mm	30	60	400	8 mL
T-75 flask	35	70	400	10 mL

Setelah antibodi E6 terkonjugasi dalam Ab-DeliverIN, kompleks ini dapat diujicobakan pada sel HeLa menggunakan Imunositokimia dengan cara : preparat yang telah disiapkan diinkubasikan menggunakan antibodi primer selama semalam (4°C), lalu cuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. Inkubasikan menggunakan antibodi sekunder *anti rabbit* (biotin) selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya tetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*), inkubasi 40 menit lalu tetesi dengan DAB (*Diamano Benzidin*) dan diinkubasi 10 menit. Tetesi dengan Mayer Hematoxylin sebagai *Counterstain* (10 menit). Preparat positif apabila terdapat warna coklat pada preparat. . MTT Assay dilakukan setelah 6 hari perlakuan menggunakan antibodi E6 dan AB-DeliverIN. Setelah itu, nilai absorbansinya diamati dengan ELISA Reader, pada panjang gelombang 570 nm. Respirasi/pernapasan sel dapat diamati melalui banyaknya cahaya yang diserap oleh protein metabolit hasil pernapasan sel HeLa yang hidup setelah diberikan dosis perlakuan, yaitu 0.5 $\mu$ g, 1 $\mu$ g, dan 2  $\mu$ g. Selain itu sel yang diperlakukan menggunakan MTT assay akan dibagi menjadi sel yang dilihat kadar telomerasenya setelah terpapar oleh antibodi E6.

### **3.5 Prosedur Pengumpulan Dan Analisis Data**

Data diambil untuk mengetahui jumlah sel HeLa yang masih hidup pasca perlakuan melalui pengukuran absorbansinya pada kalorimetri. Jika sebaran data normal dan varian data sama maka digunakan uji hipotesis *one way anova*. Namun, jika tidak sama digunakan uji *Kruskal Wallis*. Untuk melihat perbedaan dari setiap kelompok digunakan uji *Post Hoc* sebagai lanjutan *one way anova*, Penelitian ini dinilai bermakna bila  $p < 0,05$ . Uji statistik di atas dicek dengan menggunakan program statistik SPSS (Andika, 2009).



## BAB IV HASIL YANG TELAH DICAPAI

### 4.1 Produksi antibodi telomerase

Produksi antibodi telah dilaksanakan pada minggu ke-3 hingga minggu ke-13 penelitian. Antibodi yang dihasilkan sebagai respon imun tubuh kelinci, dipanen dengan cara pengambilan darah pada vena *auricularis*. Darah yang terkumpul, disimpan dalam *vacutainer* heparin pada suhu 4<sup>0</sup>C. Pengambilan darah sudah dilakukan hingga minggu ke-5 (gambar 1).

### 4.2 Purifikasi Antibodi Telomerase

Darah yang telah dipanen dipisahkan komponennya hingga mendapatkasehingga didapatkan serum (sentrifus dengan kecepatan 3500rpm selama 10 menit). Serum yang terkumpul, dipurifikasi dengan metode SAS (*Saturated Ammonium Sulfate*) untuk mendapat konsentrasi IgG poliklonal yang diinginkan. Pemurnian serum telah dilakukan hingga serum minggu ke-13.

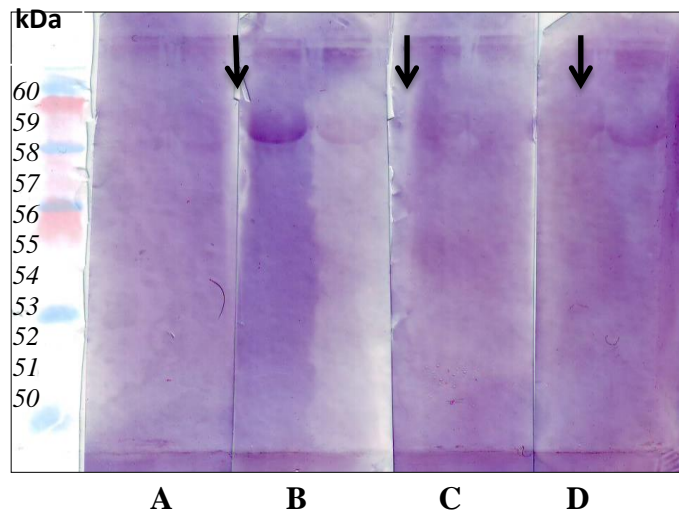
### 4.3 Profilling Protein Dan Pendeteksian Antibodi Telomerase

*Telomerase human peptide* di-*running* pada gel SDS PAGE. Pada hasil SDS PAGE, dilakukan pengamatan karakteristik antigen *Human Telomerase Peptide* (Abcam, USA), yang dibandingkan dengan protein telomerase dari sampel pasien kanker serviks. Berdasarkan hasil *Western Blot*, dilakukan pengamatan ikatan antara antigen telomerase pasien kanker terhadap antibodi telomerase yang dihasilkan dalam penelitian ini. Hasil dari profilling protein telomerase didapatkan penebalan yang signifikan pada hasil *running* sel kanker serviks, penebalan yang terjadi selanjutnya akan ditelusuri lebih lanjut mengenai *profiling* protein sesuai dengan berat molekul yang ditemukan dan dicocokkan dengan berat molekul protein *Telomerase Human Peptide*.

### 4.4 ELISA

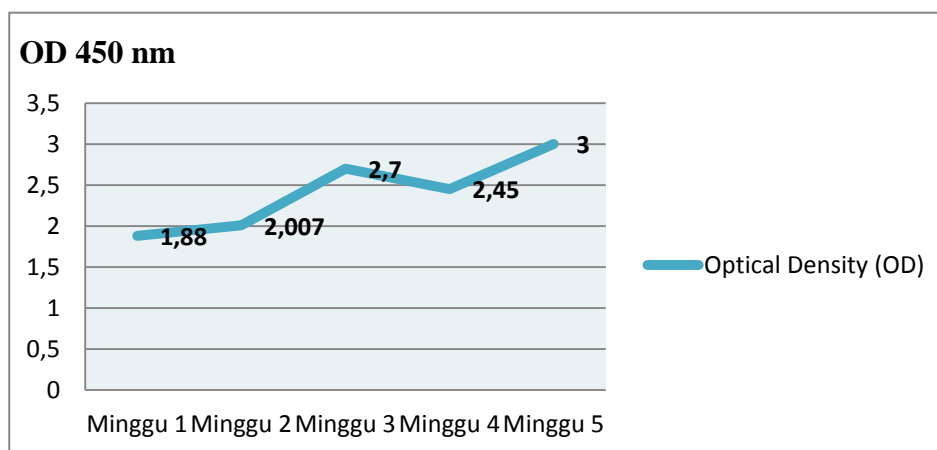
ELISA digunakan untuk mengukur kadar telomerase pada sampel yang telah diekstraksi. Reaksi ikatan antara antigen-antibodi telomerase pada ELISA akan menentukan kadar protein telomerase yang terdapat pada sampel. Antibodi primer yang digunakan adalah antibodi poliklonal telomerase yang diproduksi pada penelitian ini. Untuk antibodi sekundernya, digunakan IgG anti *rabbit* berlabel biotin, sedangkan substratnya menggunakan TMB. Ikatan yang terdapat pada antigen-antibodi ini akan diestimasi secara kuantitatif pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 450 nm. ELISA masih memerlukan waktu hingga 1 minggu lagi untuk menentukan kadar telomerase pada masing-masing sampel. Kadar antibodi telomerase yang terbentuk setiap

minggunya juga akan dianalisis pada penelitian ini, dengan tujuan untuk melihat imunogenitasnya (gambar 2).



**Gambar 1:**  
Anak panah menunjukan ikatan antara antigen dan antibodi pada membran nitroselulosa.

A :Kontrol  
B :KelinciA minggu1  
C :KelinciB minggu1  
D :KelinciB minggu2

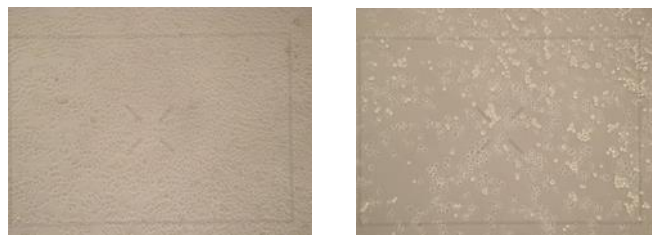


**Gambar 2.** Grafik Nilai Absorbansi dari ELISA Minggu 1-5

#### 4.5 Kultur dan perlakuan Sel HeLa menggunakan antibodi E6 dan Telomerase

Sel HeLa yang masih dalam keadaan beku dilelehkan (*thawing*). Setelah itu, dilakukan subkultur pada sel HeLa adheren (*monolayer*) (gambar 3). Sel yang telah berhasil disubkultur, dipindahkan ke sumur-sumur (*wells*), diinkubasi pada kondisi kelembapan 100%, suhu 37°C, *confluent* 70%. Setelah sel HeLa *confluent*, akan **Perlakuan menggunakan Antibodi E6 pada Sel HeLa** Sel HeLa dipaparkan pada antibodi E6 dengan kadar 0.5µg, 1µg, dan 2µg. Karena E6 berada pada intrasel, maka antibodi E6 dibawa ke dalam inti sel melalui agen penghantar antibodi, yaitu AB-DeliverIN. Sel HeLa dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok 1 adalah sel HeLa 24 *wells*

yang ditujukan untuk perlakuan imunositokimia, sementara kelompok 2 adalah sel HeLa 96 wells yang ditujukan untuk MTT Assay dimana akan dianalisis dosis optimal yang mampu menurunkan proliferasi sel HeLa paling signifikan. 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*. 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.



Gambar 3. Kultur sel HeLa yang *adherent*

#### 4.6 Ketercapaian Target

No	Progres Penelitian	<i>Timeline</i>	Ketercapaian	IKJP*
1	Produksi antibodi telomerase	5 Minggu	100%	<i>Collecting</i> darah kelinci/minggu
2	Purifikasi antibodi telomerase	4 Minggu	100%	Konsentrat IgG poliklonal
3	<i>Profiling</i> Protein dan pendeteksian antibodi telomerase	2 Minggu	100%	<i>Band/pita</i> spesifik pada membran nitroselulosa
6	ELISA	1 Minggu	100%	Preparasi seluruh ekstrak konsentrat IgG kelinci per minggunya; untuk dianalisis nilai absorbansinya
7	Kultur dan perlakuan sel HeLa menggunakan	2 Minggu	40%	Kultur sel sudah <i>attach</i> pada pita

	antibodi E6 dan Telomerase			
	TOTAL	91,5 %		

## BAB V: RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

### a) **Immunositokimia**

Sel HeLa 24 *wells* dicuci dengan PBS. Setelah itu, dilakukan *blocking* dengan FBS dan Triton X untuk mengikat lemak dan bahan pengganggu lainnya. Antibodi primer (antibodi E6) dan antibodi sekunder (IgG anti-*rabbit* Biotin) diinkubasikan pada preparat. SA-HRP (*Strep Avidin-horse radin peroxidase*) diteteskan untuk menginduksi reaksi enzimatisnya. DAB (*Diamano Benzidin*) ditambahkan dan diinkubasi sebagai pewarna/kromogen ikatan yang terjadi. *Mayer Hematoxilin* digunakan sebagai *counterstain*. Preparat *dimounting* dengan *entellan* dan ditutup dengan *cover glass*. Warna coklat di inti sel pada preparat menunjukkan ikatan yang terjadi antara antibodi E6 dengan E6 pada sel HeLa. Setelah sel HeLa diperlakukan dengan MTT juga akan dilihat kadar telomerasinya menggunakan immunositokimia dan diamati jumlah telomerasinya pada setelah diperlakukan dengan antibodi E6 pada MTT assay.

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

### c) **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*. 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.

**Daftar Pustaka**

- Campbell NA, Reece JB, Mitchell LG. 2005. *Biologi edisi 1*. Erlangga.
- Abcam. 2010. *Indirect ELISA and Western Blotting Protocol*.
- Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. Saunders Elsevier.
- Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. 2002. *Buku Ajar Patologi*. EGC.
- Hanafiah. 2005. *Statistik Kedokteran*. Jakarta: Bumi Cipta
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh KW. 2004. *Mechanism Of Human Papilloma-Induced Oncogenesis*. American Society For Microbiology.
- Cohen S, Graham M, Lovrecz G, Bache N, Robinson P, Reddel R (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells". *Science* 315 (5820): 1850–3doi:10.1126/science.1138596. PMID 17395830
- Gewin L, Galloway DA. 2001. E Box-Dependent Activation Of Telomerae By Human Papillomavirus Type 16 E6 Does not Require Induction of c-myc. *J virol*. 75:7198-7201.
- Thorland EC, Myers L, Gostout BS, Smith DI. 2003. Common Fragile Sites Are Preferential targets For HPV 16 Integration in Cervical Cancer Tumour. *Oncogen* 22: 1225-1237.







## Lampiran

### Rekapitulasi Penggunaan Dana

Biaya Pemeriksaan	
Biaya Antibodi E6	Rp. 2.550.000, 00
Biaya Pemeriksaan Laborat II	Rp. 1.231.098, 00
Biaya Telomerase Humam Peptide	Rp. 2.900.000, 00
Pembelian dan Pemeliharaan Kelinci	Rp. 1.500.000,00
Pembelian Baterai dan Fotokopi	<u>Rp. 56.000,00</u>
TOTAL	Rp. 8.237.098, 00

### Dokumentasi penelitian

		
Hewan Coba Produksi	Penginjeksian Antigen	Pengambilan Darah
		
Pengumpulan Sampel Darah Kelinci (panen)	Western Blot	Pengenceran Antigen
		
Preparasi PBS - <i>Laminar air flow</i>	Vortex dan Emulsifikasi	Analisis Laboratorium

 <p>PBS <i>cold</i></p>	 <p>Mikropipet</p>	 <p>ELISA Reader</p>
 <p>Analisis Statistik</p>	 <p>Medium PBS Sampel</p>	 <p>Analisis Sel</p>