BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian analisis deskriptif terhadap urutan nukleotida protein E6 HPV tipe 16 dari jaringan hasil biopsi segar dan hasil operasi penderita Karsinoma serviks dalam berbagai tingkatan diferensiasi (*grading*) dan stadium.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dengan cara pengambilan jaringan hasil biopsi segar dan hasil operasi penderita Karsinoma serviks yang diperoleh dari Bagian Obstetri-Ginekologi RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta periode Oktober 2007-Februari 2008, sebelumnya untuk diagnosa Karsinoma serviks ditegakkan berdasarkan gambaran Histopatologik di Bagian Patologi Anatomi (PA) Fakultas Kedokteran UGM/Bagian PA RSUP Dr. Sardjito. Pelaksanaan isolasi DNA, deteksi DNA HPV tipe 16 dan amplifikasi gen E6 HPV 16 dengan menggunakan PCR, dilakukan di Laboratorium Pusat Kedokteran Tropis Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Proses pemurnian produk PCR dan pelaksanaan *sequencing*, pelaksanaannya dilakukan di Laboratorium PT. Charoen Pokphand Indonesia

3.3. Populasi dan Subjek Penelitian

Populasi pada penelitian ini adalah seluruh penderita Karsinoma serviks (jenis skuamosa ataupun adenokarsinoma) dari berbagai stadium dan tingkatan *grading/differensiasi* yang datang berobat ke Poliklinik Kandungan RSUP Dr.Sardjito Yogyakarta periode Oktober 2007-Februari

2008. Teknik pengambilan sampel diambil dengan teknik *purposive sampling* yaitu penderita Karsinoma serviks dari berbagai stadium dan dari berbagai tingkatan *grading/differensiasi* yang ditegakkan diagnosisnya berdasarkan gambaran histopatologis sebagai Karsinoma serviks. Sampel pada penelitian ini diperoleh sebanyak 31 jaringan penderita Karsinoma serviks selama periode Oktober 2007-Februari 2008. Persetujuan berpartisipasi dalam penelitian ini adalah dengan menanda-tangani *informed consent*. Penelitian ini juga menyertakan izin *ethical clearance* kepada Komisi Etik FK UGM.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini adalah :

- Jenis Karsinoma serviks
- Tipe virus HPV
- Sekuen gena penyandi protein E6
- Varian sekuen gena penyandi protein E6

3.5. Defenisi Operasional

- Jenis jaringan Karsinoma serviks menunjukkan diagnosa secara histopatologik berupa gambaran Patologi Anatomi apakah merupakan sel tipe Skuamosa/Epidermoid atau sel tipe Adenokarsinoma yang ditetapkan oleh Dokter Spesialis Patologi Anatomi.
- Tipe virus HPV menunjukkan virus HPV tipe 16 yang dilakukan dengan proses PCR.
- Sekuen gena penyandi protein E6 adalah urutan nukleotida dari gena penyandi protein E6 *Human Papillomavirus* tipe 16 dari penderita Karsinoma serviks yang menjadi sampel.

- Varian E6 menunjukkan variasi pada urutan nukleotida gena penyandi protein E6 *Human Papillomavirus* tipe 16 dari penderita Karsinoma serviks dengan adanya perubahan susunan basa nukleotida.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan penelitian utama yang digunakan adalah jaringan hasil biopsi segar dan hasil operasi dari berbagai stadium berdasarkan gambaran histologis penderita Karsinoma serviks yang ditegakkan berdasarkan diagnosa Patologi Anatomi.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : vorteks, sentrifugasi merk *ependorf*, PCR *microtube*, *refrigerator 4°C*, *freezer -20°C*, *freezer -70°C*, pipet *ependorf* & tip 10, 20 dan 100 μ l. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600. Aiat elektroforesis dengan menggunakan *Mupid-2 mini gel migration through* (Cosmo Bio Co LTD).

3.7. Jalannya Penelitian

3.7.1. Isolasi DNA HPV dan Deteksi gen E6 DNA HPV tipe 16 dengan PCR

Isolasi DNA HPV tipe 16 dilakukan dengan menggunakan *Tripure Isolationt Reagent kit* (*Roche Applied Science*) sesuai dengan protokol yang telah ditetapkan. Deteksi DNA HPV tipe 16 dengan metode PCR menggunakan DNA hasil isolasi biopsi segar jaringan Karsinoma serviks sebagai DNA *template*. Primer yang digunakan untuk identifikasi HPV 16 adalah menggunakan gen E6 yang sangat spesifik untuk HPV 16 yaitu 5'-CGA AAC CGG TTA GTA TAA-3' dan 5'-GTA TCT CCA TGC ATG ATT-3'. Sebagai kontrol positif digunakan sel SiHa untuk HPV 16.

Kontrol negatif diperlakukan cara yang sama tanpa pemberian *template* DNA (Perez *et al.*, 2001).

Untuk proses PCR menggunakan *Faststart PCR Master (Roche Applied Science)* sesuai dengan protokol kerja yang telah ditetapkan. *FastStart PCR Master* (untuk setiap reaksi sebanyak 50 μ L), mengandung DNA Taq Polimerase, Magnesium Klorida, *Buffer 2x Mix Reaction* dan Nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Amplifikasi dilakukan sebanyak 40 siklus dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit; tiap siklus terdiri atas denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1menit 30 detik. Tahap ekstensi diperpanjang hingga 5 menit. Selanjutnya tabung didinginkan pada suhu 4°C selama 15 menit dan akhirnya dibiarkan meningkat hingga suhu mencapai suhu ruangan (Perez *et al.*, 2001)

Produk hasil PCR dianalisis menggunakan 2% gel agarose dalam *buffer* TAE 0,5-1%, dan ditambahkan etidium bromide 0,5 μ l. Elektroforesis DNA divisualisasikan dengan sinar ultraviolet (Van den Brule *et al.*, 1990).

3.7.2. Sekuensing Hasil PCR

Proses sekuensing dengan metode *Dye terminator Cycle Sequencing* menggunakan *sequencer AB Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)* dengan 4 kapiler dilakukan di Laboratorium PT Charoen Pokphand Jakarta, Indonesia.

3.7.3. Analisa Hasil

Analisa hasil dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif. Hasil urutan nukleotida pada daerah E6 HPV 16 tersebut di posisikan (*align*) menggunakan *ClustalX (1.81)* dan *Bioedit*

5.0.6. Kemudian dengan menggunakan *Genedoc 2.6.002*, urutan nukleotida yang telah diposisikan diubah menjadi protein dan divisualisasikan dalam bentuk urutan asam amino.