

metode penelitian

by Nada F

Submission date: 04-Jul-2018 07:04PM (UTC+0700)

Submission ID: 980365614

File name: nada_turnitin.docx (243.94K)

Word count: 2262

Character count: 14597

¹ ABSTRAK

Hingga saat ini kanker masih menjadi masalah kesehatan di berbagai Negara di dunia termasuk di Indonesia. Akhir-akhir ini sedang banyak dilakukan penelitian tentang penggunaan teknologi nanopartikel¹ emas untuk mendiagnosis dan juga untuk penatalaksanaan penyakit kanker. Nanopartikel merupakan suatu bentuk material biologis dan sintetik yang dimensinya $< 1 \mu\text{m}$. fokus pada penelitian ini ialah dilakukan konjugasi antara modifikasi scFv dengan nanopartikel emas untuk mengembangkan imunosensor kolorimetri yang spesifik. Target yang digunakan ialah antibodi (IgG kelinci). Setelah dilakukan penambahan IgG kelinci, larutan uji berubah warna dari merah ke ungu muda akibat adanya agregasi yang terbentuk. Berdasarkan agregasi tersebut, konjugasi⁶ modifikasi scFv dengan nanopartikel emas menunjukkan sensitivitas yang baik. Oleh karena itu, teknologi ini dapat digunakan untuk analisis protein dan diagnostik klinis.

Kata kunci: Nanopartikel, Kanker, Konjugasi, Immunoassay

ABSTRACT

⁸ Until now, cancer is still a health problem in various countries¹ in the world including in Indonesia. Lately there is a lot of research about the use of gold nanoparticle technology to diagnose and also for the management of cancer. Nanoparticles are all forms of biological and synthetic materials whose dimensions are $< 1 \mu\text{m}$. The focus of this study⁴ as to do a conjugation between modification of scFv and gold nanoparticle⁴ to develop a specific colorimetric immunosensor. The target used is antibodies⁴ (rabbit IgG). After the addition of rabbit IgG,⁴ the test solution changes color from red to purple due to aggregation that is formed. Based on the aggregation, the conjugation of scFv modification with⁴ gold nanoparticles shows good sensitivity. Therefore, this technology can be used for protein analysis and clinical diagnostics.

Keyword: Nanoparticle, Cancer, Conjugation, Immunoassay

PENDAHULLUAN

Kanker payudara merupakan kelainan ganas pada jaringan payudara

yang dapat berasal dari epitel duktus maupun lobulusnya.¹ Sel kanker dapat timbul apabila telah terjadi mutasi genetik sebagai akibat dari adanya

kerusakan DNA pada sel normal (pertumbuhan sel yang tidak normal) (Dewi & Hendrati, 2015). Walaupun begitu, hingga saat ini belum diketahui secara pasti faktor penyebab utama penyakit tumor/kanker payudara, diperkirakan multifaktorial. Dari beberapa studi diketahui faktor-faktor yang berhubungan dengan tumor/kanker payudara antara lain umur tua (*aging*), perempuan 100 kali lebih berisiko dibandingkan dengan laki-laki, adanya faktor genetik seperti riwayat keluarga menderita tumor/kanker, riwayat menstruasi dini, usia makin tua saat menopause, hamil pertama di usia tua, menggunakan kontrasepsi hormonal, obesitas dan asupan rendah serat, tinggi lemak khususnya lemak jenuh (Sihombing & Sapardin, 2014).

Sebanyak 30% dari kasus kanker payudara disebabkan oleh ekspresi berlebih *Human Epidermal Receptor-2* (HER-2) (Gibbs, 2000). Oleh karena itu, HER-2 dapat digunakan sebagai penanda (*marker*) yang spesifik bagi penyakit kanker payudara. HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) adalah salah satu keluarga reseptor tirosin kinase yang merupakan anggota dari *erbB/epidermal growth factor receptor* (EGFR). Reseptor ini memediasi proses diferensiasi dan proliferasi sel baik pada jaringan-jaringan embrio maupun sel dewasa (Pohlmann & Mernaugh, 2009). Ekspresi berlebih reseptor HER-2 mampu menginduksi dimerisasi secara spontan dan terjadi autofosforilasi, dan memicu terjadinya aktivasi *focal adhesion kinase* (FAK) sehingga mampu menginduksi

terjadinya proses migrasi dan metastasis sel kanker (Johnson, et al., 2010).

HER-2 mempunyai karakteristik struktur yang terdiri dari ligan ekstraseluler (*extracellular ligand-binding domain*), suatu transmembran, *tyrosine kinase domain*, dan ujung karboksil terminal. Serupa dengan semua reseptor EGFR, HER2 adalah transmembran glikoprotein tipe 1 yang terdiri dari tiga domain yang berbeda: domain N-terminal ekstraseluler (ECD), domain transmembran α -helix tunggal (TM), dan domain tirosin kinase intraseluler (Spector, Xia, El-Hariry, Yarden, & Bacus, 2007).

Kemunculan HER-2 dapat deteksi oleh modifikasi scFv (*Single Chain Fragment Variable*) yang nantinya dapat berikatan dengan

reseptor HER-2 yang muncul akibat terjadinya kanker. Scfv sendiri merupakan gabungan polipeptida antara domain pada rantai *variable heavy* (V_H) dan rantai *variable light* (V_L) dari imunoglobulin dan dihubungkan oleh peptida pendek (10-25 asam amino) untuk menstabilkan molekul serta diperlukan untuk berikatan dengan antigen. Peptida penghubung ini biasanya mengandung banyak asam amino glisin, serin atau treonin (Shen et al, 2005).

Protein model scFv ini memiliki spesifisitas yang sama dengan asalnya yaitu imunoglobulin, hanya terjadi penghilangan daerah yang konstan dan penambahan peptida penghubung. ScFv memiliki ukuran yang kecil dan bersifat homogen, sehingga scFv lebih disukai dibanding antibodi monoklonal

atau poliklonal untuk deteksi antigen (Peterson, Owens, & Henry, 2006).

Untuk mengetahui hasil deteksi reseptor HER-2 yang mengindikasikan kanker oleh scFv rekombinan maka dilakukan penggabungan modifikasi scFv tersebut dengan nanopartikel emas. Penggunaan nanoteknologi dalam diagnosis dan pengobatan berkembang semakin pesat. Salah satunya yaitu penggunaan nanopartikel emas yang mana telah dikembangkan untuk berbagai terapi seperti pengobatan dan diagnosis pada penyakit kanker (Sastyarina et al, 2017). Sedang berkembang juga penelitian mengenai nanopartikel emas sebagai agen citra. Seringnya nanopartikel emas digunakan sebagai agen deteksi dan pengobatan kanker karena radioaktif emas (^{198}Au)

memiliki kemampuan pemancar radiasi beta (β -partikel) dan sinar gamma (γ -ray) dengan waktu paruh 2,69 hari, serta memiliki jarak efisien sekitar 1 mm dari jaringan sel kanker. Radiasi beta ($\beta=961$ keV) yang dipancarkan memiliki energi yang cukup tinggi untuk membunuh sel kanker dan radiasi gamma ($\gamma=412$ keV) yang dapat digunakan untuk melakukan pencitraan sebaran nanopartikel emas di dalam tubuh (Halid & et al, 2017). *National Cancer Institute* mendefinisikan nanopartikel sebagai semua bentuk material biologis dan sintetik dengan dimensi < 1 μm . Nanopartikel sering disebut pula nanocarrier, nanomaterial, atau nanosomes. Nanopartikel dalam penatalaksanaan kanker dikembangkan sebagai *drug-delivery vehicle* (*carrier*), *contrast agent* (*imaging*),

diagnostic device, platform untuk *theranostic agents* (agent yang berfungsi sebagai alat diagnosis dan terapi), antioksidan (mampu bereaksi dengan radikal bebas di jaringan), *in vivo tumor targeting* dengan spesifisitas dan afinitas yang tinggi, serta probe pada riset prelinik untuk studi molekuler penyakit (Artini, 2013).

Pada penelitian kali ini nantinya akan memformulasikan modifikasi scFv dengan nanopartikel emas menjadi immunoassay berbasis kolorimetri sehingga memberikan kemudahan untuk mendeteksi dengan alat spektrofotometri secara kualitatif dan kuantitatif. Nantinya konjugasi antara nanopartikel (NP) emas dengan modifikasi scFv akan berikatan dengan antibodi (IgG) kelinci yang digunakan

sebagai targetnya (penanda kanker). Antibodi merupakan glikoprotein yang berbentuk seperti huruf “Y” yang disekresi oleh sel B. Antibodi diproduksi sebagai respon imun pertahanan tubuh ketika terdapat molekul asing atau senyawa racun (Zeng, Shen, & Mernaugh, 2012). Bagian lengan “Y” pada antibodi mengandung daerah yang dapat berikatan dengan dua antigen dan mengenali objek yang spesifik (*fragment antigen binding (Fab)*). Paratop berada diujung lengan “Y” antibodi. Daerah ini merupakan ujung terminal asam amino yang mengandung daerah variabel dari rantai ringan dan rantai berat (*fragment variable (Fv)*) dan merupakan daerah penting untuk pengikatan antigen (Short, et al., 2005). Setelah dilakukan penelitian ini diharapkan metode ini

dapat digunakan juga untuk mendiagnosis kanker payudara.

METODE

6

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan ialah penangas air, alat-alat gelas, inkubator, *micropore filter*, mikropipet, pengaduk, *Transmission Electron Microscope* (TEM) dan Malvern Zetasizer Nano ZS. Pengukuran penyerapan UV-Vis dilakukan menggunakan spektrofotometer Cary 100 Bio UV-Vis pada suhu ruang. Sentrifugasi dilakukan menggunakan SORVALL RC 5c Plus pada suhu 10°C. Pengamatan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dilakukan menggunakan jeol-2010 FasTEM yang beroperasi pada 200 kV (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Bahan-bahan yang digunakan ialah *gold nano partikel* (GNP), sodium sitrat dihidrat, hydrogen tetrakloroaurat trihidrat, larutan scFv, dan larutan PBS (*phosphate buffer saline*).

Penyiapan Nano Partikel Emas (GNP)

GNP disiapkan dengan menggunakan *hydrogen tetrachloroaurate* (HAuCl₄). Sebanyak 1,75 mL larutan natrium sitrat 38,8 mM ditambahkan dengan cepat ke dalam 50 mL larutan asam tetrakloroaurat mendidih kemudian diaduk dengan kuat, larutan tersebut dididihkan selama 15 menit. Larutan berwarna merah anggur akan diperoleh, kemudian larutan tersebut didinginkan hingga suhunya mencapai suhu kamar, lalu difilter menggunakan

micropore filter 0,2 μm . Larutan koloidal disimpan pada suhu 4°C. Ukuran nanopartikel yang diinginkan ialah sebesar 15 nm (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Pembuatan Larutan Phosphate Buffer Saline (PBS)

Larutan dibuat dengan cara melarutkan 4 g NaCl, 0,575 g Na_2HPO_4 , 0,1 g KH_2PO_4 dan 0,1 g KCl dalam 30 ml akuabides steril menggunakan pengaduk magnetik. Selanjutnya dilakukan pengaturan pH dengan penambahan HCl 1 M dan NaOH 1 M hingga pH larutan mencapai 7,2. Setelah itu, volume larutan digenapkan hingga 500 mL kemudian disimpan pada suhu 2-4°C.

Konjugasi scFv dengan Nano Partikel Emas

Larutan GNP yang sudah diperoleh, disentrifugasi selama 25 menit pada 15000 x g dan didispersikan ke dalam larutan buffer fosfat pH 7,2 dengan volume yang sama. Diambil 1 ml larutan tersebut kemudian ditambahkan 50 μL larutan scFv (0,31 mg/mL). setelah itu, larutan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, untuk memisahkan larutan scFv yang tidak terikat pada GNP dipisahkan dengan sentrifugasil selama 20 menit dengan kecepatan 8000 rpm. GNP yang sudah distabilkan dengan scFv diresuspensikan dalam larutan PBS (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Penentuan Ukuran Partikel

Ukuran partikel emas ditentukan menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dan Malvern Zetasizer Nano ZS. Larutan yang

digunakan ialah kurang lebih 1,0 mL (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Uji Agregasi

Disiapkan antibodi (IgG kelinci), kemudian ditambahkan ke scFv-GNP sambil diaduk. Setelah 30 menit reaksi warna yang berubah direkam menggunakan spektrofotometri UV-VIS. Agregasi nanopartikel emas menginduksi pergeseran pita resonansi. Kemudian intensitas warna di 520 nm akan menurun, selain itu, terjadi peningkatan pada 620 nm. Perubahan rasio warna ini menentukan tingkat aktivitas pengikatan antibodi dengan scFv yang berhubungan dengan agregasi nanopartikel emas (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Instrumental

Sinar untuk pengukuran UV-Vis ialah 1 cm, konsentrasi nanopartikel emas sebesar 3 nm dengan diameter 15 nm. Sampel disiapkan dengan meneteskan 5 μ L larutan koloid emas ke dalam kisi tembaga berlubang yang ditutupi oleh film karbon tipis. Setelah 5 menit, larutan terjepap oleh kertas saring. Kemudian kisi dikeringkan dan dicitrakan. Total spektrum (ATR)-FTIR yang dilemahkan diukur menggunakan spektrometer Bio-Rad 175c FTIR yang dipasang dengan kit Specac ZnSe Crystal ATR. Sistem ini dibersihkan menggunakan aliran N₂ untuk menghilangkan CO₂ dan air sebelum mengumpulkan spektrum IR. Larutan koloid kemudian dimasukkan ke ZnSe untuk selanjutnya dikarakterisasi (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

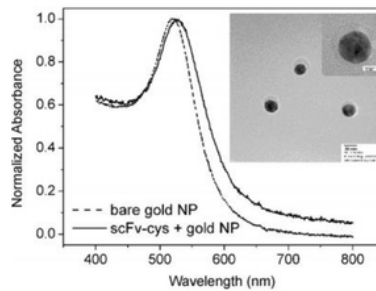
HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknologi menggunakan nanopartikel emas sebagai pembawa dalam diagnosis kanker telah menjadi tren dalam bidang klinis (Martien, Adhyatmika, Irianto, Farida, & Sari, 2012). Hal tersebut dapat terjadi karena teknologi menggunakan nanopartikel emas memberikan banyak keunggulan seperti nanopartikel emas mampu menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Buzea, Blandino, & Robbie, 2007), memiliki stabilitas tinggi, kapasitas tinggi, terlindung dari degradasi, pelepasan terkontrol, tolerabilitas yang sangat baik dan memungkinkan rute administrasi parenteral, oral, subkutan, optalmik dan rektal (Bawarski, Chidlowsky, Bharali, & Mousa, 2008),

aman dan memenuhi persyaratan dosis (Merisko-Liversidge & Liversidge, 2008).

Nanopartikel emas ini dapat mencapai target dengan mekanisme targeting aktif dan pasif. Pada tipe pasif, nanopartikel akan masuk ke dalam aliran darah yang kemudian akan terakumulasi di lokasi target akibat penargetan permeabilitas dan efek retensi. Sedangkan tipe aktif ialah dengan mekanisme ligan reseptor. Dalam hal ini, molekul ligan seperti antibodi dan peptida akan mengenali antigen tumor yang spesifik (Nie, 2010). Berdasarkan penelitian sebelumnya juga sudah dibuktikan bahwa teknologi menggunakan nanopartikel emas ini tidak efek toksisitas bagi penggunaannya (Inggriani & Husni, 2017).

Hasil yang diperoleh pada gambar di bawah ini penelitian kali ini ditunjukkan oleh

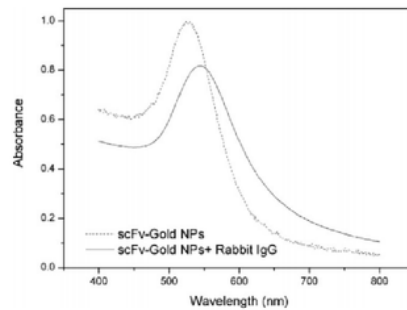


Pada gambar di atas, garis putus-putus menunjukkan spektrum absorbansi UV-Vis dari nanopartikel emas. Puncak maksimum ditunjukkan pada panjang gelombang 520 nm, hal tersebut merupakan gambaran/hasil dari nanopartikel emas yang berukuran 15 nm. Garis yang tidak putus-putus (*solid line*) menunjukkan absorbansi spektrum UV-Vis dari konjugasi nanopartikel emas dengan scFv-cys. Berdasarkan spektrum tersebut, jelas ditunjukkan bahwa terjadi pergeseran spektrum dari 520 ke 525 setelah

merekombinasikan nanopartikel emas dengan protein scFv-cys. Panjang gelombang resonansi dan bandwidth nanopartikel emas bergantung pada ukuran dan bentuk partikel, indeks bias dari medium sekitarnya, dan dipengaruhi oleh suhu. Pergeseran spektrum setelah konjugasikan dengan scFv-cys ialah karena terjadi perubahan sifat dielektrik yang mengelilingi nanopartikel emas akibat kehadiran scFv-cys tersebut (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

Selain ukurannya yang berkurang, hal penting lainnya ialah konjugasi dengan scFv mampu mengikat antigen dengan afinitas yang sama dengan antibody secara umum. Molekul scFv A10B secara spesifik mengikat antigen IgG kelinci yang

digunakan. Setelah terikat dengan IgG kelinci, perubahan warna terlihat pada konjugasi nanopartikel emas dengan scFv-cys dari yang awalnya berwarna merah terang ke warna ungu muda (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

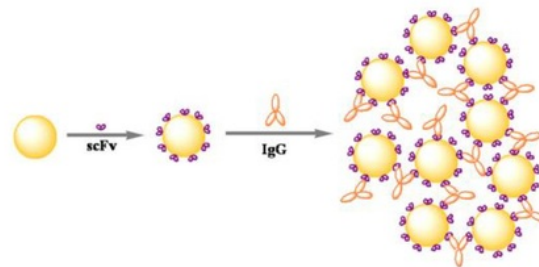


Pada gambar di atas, garis putus-putus menunjukkan spectrum dari konjugasi nanopartikel emas dengan scFv-cys tanpa terikat dengan antibody (IgG kelinci) dan garis yang tidak putus-putus (*solid line*) menunjukkan konjugasi nanopartikel emas dengan scFv-cys yang sudah berikatan dengan antibody. Berdasarkan gambar tersebut,

puncak spectrum nanopartikel emas bergeser dari 520 nm ke 542 nm ketika terjadi penambahan IgG kelinci. Agregasi partikel biasanya menghasilkan pergeseran dan atau perluasan peak, yang disebabkan akibat *near-field coupling* diantara partikel yang berdekatan. Selain itu, besarnya pergeseran juga tergantung

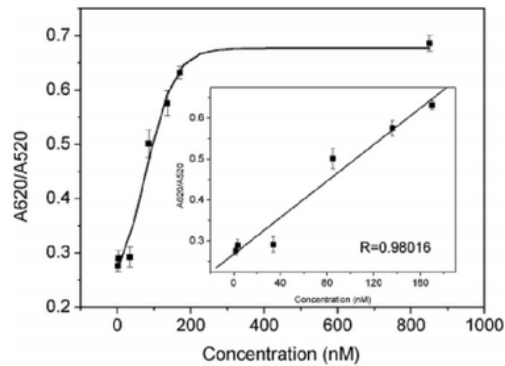
pada jarak antar partikel dan ukuran agregasi yang terbentuk. Hasil TEM yang diperoleh menunjukkan bahwa nanopartikel emas tersebar dengan baik ketika belum ditambahkan IgG kelinci. Namun setelah ditambahkan IgG kelinci, nanopartikel emas bergabung menjadi satu membentuk jaringan pada skala mikrometer, dan membentuk agregasi yang terdiri dari ratusan nanopartikel emas. Seperti

yang telah diketahui, setiap nanopartikel emas akan menangkap satu tangan dari molekul IgG kelinci yang digunakan. Oleh karena itu, maka akan terbentuk agregasi scFv-cys nanopartikel (NP) akibat penambahan IgG kelinci tersebut. Skema penggabungan tersebut digambarkan pada gambar di bawah ini (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).



Perubahan/pergeseran spectrum dan laju agregasi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi IgG yang dilakukan. Konsentrasi IgG yang lebih tinggi akan menyebabkan perubahan/pergeseran

yang lebih besar dan menyebabkan pembentukan agregat yang lebih cepat dibandingkan dengan konsentrasi IgG yang lebih rendah (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).



Gambar di atas menunjukkan rasio absorbansi A620/A520 dari konjugasi NP emas dengan scFv-cys setelah penambahan IgG kelinci yang direkam selama 30 menit. Berdasarkan grafik yang diperoleh, peningkatan konsentrasi IgG kelinci juga menyebabkan peningkatan A620/A520. Dari grafik di atas diperoleh nilai koefisien relative/nilai R nya sebesar 0,89. Nilai tersebut jauh

lebih baik dari hasil penelitian lain yang dilaporkan untuk immunoassay serupa yang menggunakan antigen yang dilapisi nanopartikel dan IgG atau protein A (Zhang, Zhang, Wang, Tang, & Lu, 2003). Tes seperti ini dapat digunakan sebagai alat diagnosa di klinik karena sudah terbukti bersifat spesifik (Liu, Liu, Mernaugh, & Zeng, 2009).

metode penelitian

ORIGINALITY REPORT

16%

SIMILARITY INDEX

12%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

7%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	media.neliti.com Internet Source	6%
2	www.neliti.com Internet Source	3%
3	journal.unpad.ac.id Internet Source	2%
4	Liu, Y.. "Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay", Biosensors and Bioelectronics, 20090515 Publication	2%
5	Rohadi Awaludin. "PEMBUATAN NANOPARTIKEL EMAS RADIOAKTIF DENGAN AKTIVASI NEUTRON", MAKARA of Technology Series, 2010 Publication	1%
6	ml.scribd.com Internet Source	1%

7

Submitted to University of Auckland

Student Paper

1%

8

"Abstracts", Public Health Nutrition, 2013.

Publication

<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography Off