PERBEDAAN EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN TERHADAP STRESS OKSIDATIF H_2O_2 PADA *CELL LINE* CASKI

PROPOSAL SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan

Mencapai Derajat Sarjana Kedokteran

CHRISTOPHER ANDREW TEGUH

NIM: 030002200041

UNIVERSITAS TRISAKTI

FAKULTAS KEDOKTERAN

JAKARTA, JUNI 2025

Bidang Ilmu: Biomolekuler Klinik

PERBEDAAN EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN TERHADAP STRESS OKSIDATIF H_2O_2 PADA *CELL LINE* CASKI

PROPOSAL SKRIPSI



Disusun Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan

Mencapai Derajat Sarjana Kedokteran

CHRISTOPHER ANDREW TEGUH

NIM: 030002200041

UNIVERSITAS TRISAKTI

FAKULTAS KEDOKTERAN

JAKARTA, JUNI 2025

PERSETUJUAN

Proposal Skripsi/ Skripsi

Judul:

PERBEDAAN EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN TERHADAP STRESS OKSIDATIF H_2O_2 PADA *CELL LINE* CASKI

Nama mahasiswa: Christopher Andrew Teguh

NIM 030002200041

Telah disetujui untuk diuji di hadapan

Tim Penguji Proposal Skripsi/ Skripsi

Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

Pada Hari ……..... , Tanggal ..... 20....

Pembimbing

PENGESAHAN PROPOSAL

Judul:
PERBEDAAN EKSPRESI GEN ANTIOKSIDAN TERHADAP STRESS OKSIDATIF H_2O_2 PADA *CELL LINE* CASKI

Nama Mahasiswa: Christopher Andrew Teguh

NIM: 030002200041

Telah diuji dan disahkan dihadapan

Dewan Penguji Proposal

Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

Pada Hari Senin, Tanggal 22 Januari 2025

Ketua Penguji
Nama : dr. Meiyanti, Sp.FK.
NIK : 2492/USAKTI

Penguji I
Nama : dr. Joice Viladelvia Kalumpiu, Sp.FK.
NIK : 3099/USAKTI

Penguji II
Nama : dr. Monica Dwi Hartanti, M.Biomed, Ph.D.
NIK : 2903/USAKTI

Jakarta, 30 Juni 2025

Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Trisakti

Dr. dr. Yenny, Sp.FK

NIK: 2613/USAKTI

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Christopher Andrew Teguh

NIM : 030002200041

Program Studi : Kedokteran

Alamat Korespondensi : Jl. Janur Hijau VI Blok TE 1 No.3

Telepon / mobile : 081346301873

E-mail : 030002200041@std.trisakti.ac.id

Judul skripsi : Perbedaan Ekspresi Gen Antioksidan terhadap Stress Oksidatif H_2O_2 pada *Cell Line* CaSki

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah benar-benar merupakan hasil karya ilmiah saya sendiri. Skripsi ini belum pernah diajukan sebagai suatu karya ilmiah untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar isi.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini merupakan hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai dengan SK Permendiknas No.17 tahun 2010 tentang pencegahan dan penanggulangan plagiat di perguruan tinggi.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya, agar dapat dimanfaatkan sebagaimana mestinya.

Jakarta, ….....20…

Christopher Andrew Teguh

NIM 030002200041

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING II
HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI DAN DEKAN..... *iii*
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN..... iv
DAFTAR ISI v
DAFTAR GAMBAR..... viii
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR SINGKATAN x
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar belakang 1
1.2 Perumusan masalah..... 3
1.3 Tujuan 3
1.3.1 Tujuan umum 3
1.3.2 Tujuan khusus 3
1.4 Hipotesis..... 3
1.5 Manfaat..... 3
1.5.1 Bagi pengembangan ilmu pengetahuan..... 3
1.5.2 Bagi profesi..... 3
1.5.3 Bagi masyarakat..... 3

BAB II TINJAUAN DAN RINGKASAN PUSTAKA 4
2.1 Tinjauan pustaka 4
2.1.1 Kanker serviks dan HPV..... 4
2.1.2 *Cell line* SiHa 4
2.1.3 Antioksidan dan gen pengekspresi antioksidan 5

2.1.4 SGK3 (Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Family Member 3) 7

2.2 Ringkasan pustaka 9

2.3 Kerangka teori 10

BAB III KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL ... 11

3.1 Kerangka konsep 11

3.2 Variabel penelitian 11

3.2.1 Variabel tergantung 11

3.2.2 Variabel bebas 11

3.3 Definisi operasional 12

BAB IV METODE 14

4.1 Desain penelitian 14

4.2 Lokasi dan waktu penelitian 14

4.3 Cara penelitian 14

4.3.1 Sampel 14

4.3.2 Kriteria inklusi 14

4.3.3 Kriteria eksklusi 14

4.3.4 *Harvest cell line* 15

4.3.5 Ekstraksi RNA (*Total RNA Purification*) 15

4.3.6 Sintesis c DNA (*cDNA synthesis*) 16

4.3.7 *Quantitative real-time PCR* 16

4.4 Bahan dan instrumen 17

4.4.1 Bahan 17

4.4.2 Alat 17
4.5 Analisis statistik 17
4.5.1 Analisis univariat 17
4.5.2 Analisis bivariat 18
4.6 Alur kerja penelitian 19
4.7 Etika penelitian 20
4.8 Penjadwalan penelitian 21
DAFTAR PUSTAKA 22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kerangka teori 10
Gambar 2. Kerangka konsep 11
Gambar 3. Alur kerja 19

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Ringkasan pustaka 9
Tabel 2. Definisi operasional 12
Tabel 3. Sekuens *primer* 17
Tabel 4. *Dummy table* perbedaan ekspresi gen pada konsentrasi hidrogen peroksida tinggi dan rendah 18
Tabel 5. Penjadwalan pelaksanaan penelitian 21

DAFTAR SINGKATAN

GPX1	: *glutathione peroxidase 1*
SOD2	: *superoxide dismutase 2*
CAT	: *catalase*
SGK3 *member 3*	: *serum/glucocorticoid regulated kinase family*
GAPDH	: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
HPV	: *human papillomavirus*
DNA	: *deoxyribonucleic acid*
RNA	: *ribonucleic acid*
ROS	: *reactive oxygen species*
PI3K/AKT	: *phosphatidylinositol 3-kinase*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Infeksi HPV (*Human Papillomavirus*) yang onkogenik menyebabkan sekitar 95% kasus-kasus kanker serviks (leher rahim) di seluruh dunia.[1]Dari tipe-tipe HPV, HPV 16 dan HPV 18 menyebabkan lebih dari 70% kasus kanker serviks dan 20% disebabkan tipe HPV lain.[2,3] Di Indonesia kanker serviks menempati peringkat kedua jumlah kasus kanker terbanyak pada wanita dengan 36,633 kasus pada tahun 2020.[3] Infeksi HPV seringkali bisa diatasi oleh respons imun seseorang tanpa pengobatan. [4,5] Namun, sekitar 10% individu akan mengalami infeksi yang persisten dan berujung menjadi kanker pada 1% individu.[5] Patogenesis kanker serviks memiliki kaitan erat dengan stress oksidatif, di mana peningkatan ROS (*reactive oxygen* species) dapat menyebabkan kerusakan DNA (*deoxyribonucleic acid*) sehingga ada kemungkinan karsinogenesis.[6,7]

Terdapat sistem dalam tubuh yang menjaga keseimbangan level oksidasi atau disebut sebagai homeostasis redoks, pada sistem ini terdapat antioksidan enzimatis—GPx (*glutathione peroxidase*), SOD (*superoxide dismutase*), CAT (*catalase*) dan sistem TrX (*thioredoxin*)—dan antioksidan non enzimatis, seperti vitamin A, C, dan E.[6,8] Kerja antara gen-gen antioksidan saling berpengaruh satu sama lain.[9] Deregulasi gen tertentu pada sel akibat *oncoprotein* mengubah kondisi stress oksidatif pada sel-sel.[4] Hidrogen peroksida (H_2O_2) termasuk ROS dan dihasilkan saat metabolisme sel serta berkontribusi terhadap stress oksidatif.[7] H_2O_2 sering digunakan dan diukur dalam penelitian *in vitro cell line* untuk melihat respon sel terhadap stress oksidatif atau suatu intervensi.[10–12]

Wang M *et al* melaporkan bahwa kerja katalase dipengaruhi secara langsung dan tidak langsung oleh gen SGK3 (*serum/glucocorticoid regulated kinase family member 3*), di mana SGK3 dengan katalase terlibat dalam suatu aksis penyampaian sinyal yang dapat memicu perkembangan lebih lanjut kanker serviks.[11]

Cell line adalah suatu kultur *in vitro* dari sel yang mencapai tahap dimana sel dapat bertahan hidup tanpa batas waktu (*indefinite survival*), dapat dibekukan dan diambil berulang kali tanpa batas secara teori.[13] *Cell line* CaSki merupakan model *in vitro* yang relevan untuk penelitian ini karena *cell line* CaSki berasal dari kanker serviks manusia yang mengandung *Human Papillomavirus* (HPV) tipe 16, salah satu tipe yang sering dikaitkan dengan kejadian kanker serviks di Indonesia.[14,15] Penelitian Zhang *et al* menemukan bahwa perbedaan konsentrasi H_2O_2 (250 μM dan 1000 μM) mampu menurunkan proliferasi (*survival rate*) beberapa jenis *cell line* kanker serviks.[10]

Penelitian ini bertujuan untuk menambah wawasan akan patogenesis kanker serviks dengan meneliti perbedaan ekspresi gen-gen antioksidan pada *cell line* CaSki yang diberikan konsentrasi H_2O_2 (hidrogen peroksida) yang berbeda.

1.2 Perumusan masalah

Apakah terdapat perbedaan ekspresi gen antioksidan pada cell line CaSki yang diberikan H_2O_2 dengan dosis berbeda?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mendukung pengembangan biomarker stress oksidatif melalui analisis perbedaan ekspresi gen antioksidan pada *cell line* CaSki yang diberikan H_2O_2 dengan dosis yang berbeda.

1.3.2 Tujuan khusus

- Untuk menentukan perbedaan ekspresi gen-gen antioksidan pada kondisi tingkat stress oksidatif tertentu (H_2O_2 konsentrasi tinggi dan rendah) pada *cell line* CaSki.

1.4 Hipotesis

- Ada perbedaan ekspresi gen-gen antioksidan pada cell line CaSki yang diberikan H_2O_2 dengan dosis yang berbeda.

1.5 Manfaat

1.5.1 Bagi pengembangan ilmu pengetahuan

- Penelitian dapat menambah wawasan mengenai kerja gen-gen antioksidan dan SGK3 sebagai dasar pengembangan biomarker antioksidan.

1.5.2 Bagi profesi

- Hasil penelitian dapat mendukung dalam menurunkan prevalensi kanker serviks.

1.5.3 Bagi masyarakat

- Penelitian dapat menambah wawasan mengenai peran gen-gen antioksidan dalam perkembangan kanker serviks.

BAB II

TINJAUAN, RINGKASAN PUSTAKA, KERANGKA TEORI

2.1 Tinjauan Pustaka

2.1.1 Kanker Serviks dan HPV

Kanker serviks menempati posisi keempat dalam kasus-kasus kanker.[3,7] Etiologi utama kanker serviks adalah infeksi oleh tipe-tipe HPV yang karsinogenik, seperti HPV 16 dan 18. HPV (*Human Papillomavirus*) adalah virus tanpa *envelope*, dengan DNA *double-stranded* yang dapat menginfeksi sel kulit atau sel mukosa dengan masuk melalui lesi mikro (*microlesion*) pada epitel dan kemudian menyebar sampai lapisan basal.[5] Tipe HPV yang memiliki aktivitas tinggi pada gen E6 dan E7 bersifat lebih karsinogenik dan berperan dalam menyebabkan kelainan dalam jalur-jalur regulasi siklus sel, seperti jalur p53 sehingga dapat menyebabkan proliferasi sel tidak terkendali.[7,16] Saat HPV menginfeksi suatu organisme maka akan terjadi pemadaman ekspresi gen E2 yang menginhibisi ekspresi E6 dan E7 sehingga ekspresi E6 dan E7 meningkat secara berlebihan.[17] Dampak dari ekspresi *oncoprotein* E6 dari virus adalah destabilisasi *tumor suppressor p53*, inhibisi *p53 K120*-acetylation, dan mencegah apoptosis yang dependen terhadap p53.[18] Di samping itu, invasi tumor dipengaruhi oleh stress oksidatif, inhibisi gen supresor tumor p53 yang seharusnya berosilasi sebagai respons anti kanker.[4,16]

Infeksi HPV seringkali dapat diatasi oleh respons imun seseorang sehingga terjadi klirens infeksi dan proses ini terjadi setelah respons inflamasi yang diikuti oleh eliminasi episom dan reduksi *viral load*.[4] Patogenesis kanker serviks karena infeksi HPV membutuhkan waktu yang lama dan tes untuk mendeteksi infeksi dapat menunjukkan hasil negatif dan positif pada waktu berbeda.[19]

2.1.2 *Cell line CaSki*

Cell line adalah suatu kultur *in vitro* dari sel yang mencapai tahap dimana sel dapat bertahan hidup tanpa batas waktu (*indefinite survival*) dan dapat dibekukan dan diambil kembali secara tidak terbatas bila dilihat dari segi teoritis.

Cell line akan mempertahankan sifat-sifat dan karakteristik yang sama dengan jaringan atau sel asalnya jika kondisi-kondisi tertentu terpenuhi.[13] CaSki merupakan *cell* line yang memiliki morfologi epithelial dan diisolasi dari pasien yang merupakan perempuan kaukasia berusia 40 tahun dengan karsinoma epidermoid.[20] CaSki mampu mereplikasi DNA HPV (*Human Papillomavirus*) tipe 16 yang merupakan salah satu tipe HPV yang sering dikaitkan dengan kejadian kanker serviks di Indonesia.[14,15] DNA HPV16 (sekitar 600 salinan DNA HPV16 setiap sel) terintegrasi pada genom *host* sehingga meneliti *cell line* ini dapat menambah wawasan mengenai patogenesis kanker serviks yang berkaitan dengan HPV.[12,21]

2.1.3 Antioksidan dan Gen Pengekspresi Antioksidan

Dalam perjalanan penyakit, kanker serviks, sama seperti kanker lainnya, memiliki kaitan erat dengan stress oksidatif, di mana ROS yang meningkat dapat menyebabkan kerusakan DNA sehingga ada kemungkinan inisiasi perkembangan kanker. ROS juga memiliki fungsi fisiologis dalam tubuh dalam proses seluler meliputi beberapa diantaranya adalah memodulasi nekrosis, apoptosis, dan autofagi dari sel. Keberadaan ROS juga dapat menjadi faktor yang mendukung kehidupan dari sel terinfeksi. Diketahui bahwa terdapat sistem dalam tubuh yang berfungsi menjaga keseimbangan level oksidasi atau disebut sebagai homeostasis redoks, di mana terdapat anti oksidan enzimatis—GPx, SOD, CAT dan sistem TrX —dan non enzimatis, seperti vitamin A, C, dan E.[6,7]

Keberadaan enzim-enzim tersebut sudah terbukti dapat menguraikan ROS. Proses penyeimbangan antara pro-oksidan dan antioksidan ini terjadi secara dinamis melalui banyak interaksi yang masih belum dipahami secara utuh. Peran enzim SOD2 (MnSOD) adalah menguraikan oksidan (ROS) menjadi hidrogen peroksida (H2O2). Hidrogen peroksida sendiri diketahui tetap dapat menciderai sel. Untuk ini enzim GPX dan CAT mengurai H_2O_2 sehingga dapat menjadi air (H2O), oksigen molekuler, dan molekul lain. Dengan ini, keseimbangan tingkat oksidasi dalam lingkungan sel-sel terjaga.[6,16]

GPx1 merupakan salah satu tipe GPx yang paling banyak diekspresikan. GPx1 diekspresikan pada sitosol dan mitokondria.[22] GPx mengkatalisis perubahan molekul hidrogen peroksida menjadi H_2O. Diketahui bahwa ekspresi GPx1 dapat dipengaruhi oleh p53, di mana enzim SOD2 juga terpengaruh ekspresinya secara bersamaan. Pada kondisi ini ekspresi enzim katalase tidak terpengaruh oleh p53 dan ini menciptakan ketidakseimbangan ROS sehingga tercipta stress oksidatif.[6,7,22] Rasio antara SOD2 dengan katalase atau GPx mungkin dapat menjadi tolak ukur untuk prognosis pasien kanker.[23] Namun, praktik pengukuran tingkat enzim antioksidan untuk menilai stress oksidatif belum tentu mencerminkan tingkat stress oksidatif karena terdapat ritme *reactive species*.[24]

Dalam penelitian-penelitian in vivo, telah ditemukan bahwa kurangnya GPX1 meningkatkan kerusakan sel, apoptosis dan kematian sel sehingga GPX1 penting untuk mengurangi kerusakan sel yang disebabkan oleh stress oksidatif.[25] Peningkatan GPx1 dapat menjadi faktor protektif pada jaringan atau organ.[22,25] Selain itu, diketahui pula bahwa GPx1 berperan dalam proses signalling insulin karena dapat mempengaruhi konsentrasi mediator-mediator hidroperoksida.[6] Selain itu, GPX1 juga berperan dalam mempertahankan tingkat fisiologis insulin dengan melindungi pankreas dari stress oksidatif akibat H_2O_2 (hidrogen peroksida).[26] CAT juga memiliki peran dalam perlindungan pankreas dari cidera akibat H2O2 (hidrogen peroksida). [8]

GPX1 diketahui memiliki peran dalam *insulin signaling* dan SGK3 juga berperan dalam *insulin signaling*. Ekspresi SGK3 terlibat dalam jalur PI3K di mana dapat berujung pada proses angiogenesis, dan resistensi obat.[11,27]

P53 merupakan gen yang berperan dalam penghambatan atau supresi proliferasi tumor. P53 memiliki peran dalam berbagai jalur perkembangan kanker dan salah satunya ialah dalam hal homeostasis redoks. Diketahui bahwa ekspresi p53 memodulasi ekspresi SOD2 dan GPX tanpa mempengaruhi ekspresi CAT .[16,18,22]

CAT telah menunjukkan banyak peran dalam progresi kanker baik itu peran protektif atau pun memfasilitasi profilerasi lebih lanjut kanker.[23] Defisiensi *catalase* telah dihubungkan dengan kanker.[8] Salah satu ekspresi gen yang dapat mempengaruhi kerja CAT adalah ekspresi SGK3. Dengan ini, mungkin dapat terjadi runtutan kejadian yang dapat menuju angiogenesis dan resistensi obat. Adanya *signalling axis SGK3-CAT* menunjukkan bahwa mungkin ada peran SGK3 dalam hal meregulasi stress oksidatif.[11,27]

Diketahui bahwa kerja ekspresi gen-gen antioksidan memiliki hubungan satu sama lain.[9] CAT bekerja dalam peroksisom mitokondria bersama dengan GPX1 sehingga kerja kedua antioksidan ini saling mendukung satu sama lain. [6,9,22] Namun, dalam hal ekspresi telah disebutkan bahwa kedua antioksidan dipengaruhi oleh faktor-faktor yang berbeda. Ditemukan bahwa ekspresi CAT dapat dipengaruhi oleh ekspresi SGK3.[11,22] Proses penyeimbangan tingkat stress oksidatif bisa disebut sebagai proses yang dinamis, di mana tingkat stress oksidatif berfluktuasi diikuti dengan fluktuasi ekspresi gen-gen antioksidan. Dalam perkembangan kanker melalui infeksi HPV diketahui bahwa tingkat stress oksidatif dalam lingkungan mikro seluler akan terlebih dahulu meningkat dan peningkatan ini berperan dalam mempermudah integrasi genom HPV ke dalam genom host.[4]

2.1.4 SGK3 (*Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase Family Member 3*)

SGK3 (*serum/glucocorticoid regulated kinase family member 3*) adalah suatu gen yang termasuk dalam keluarga kinase AGC serin/treonin, bersama dengan isoformnya: SGK1 dan SGK2. Diketahui bahwa SGK1, yang ditemukan terlebih dahulu, berperan menstimulasi proliferasi sel kanker dan dapat digunakan sebagai biomarker pada kanker.[28]

Penelitian saat ini masih kurang mengenai peran SGK3 dalam perkembangan kanker serviks. SGK3 dihipotesiskan memiliki peran yang penting dalam perkembangan kanker.[27] Diketahui bahwa SGK3 berperan dalam proliferasi kanker payudara.[29] Ekspresi berlebihan SGK3 juga ditemukan untuk menjadi pertanda prognosis buruk di neoplasia esofagus superfisial.[30]

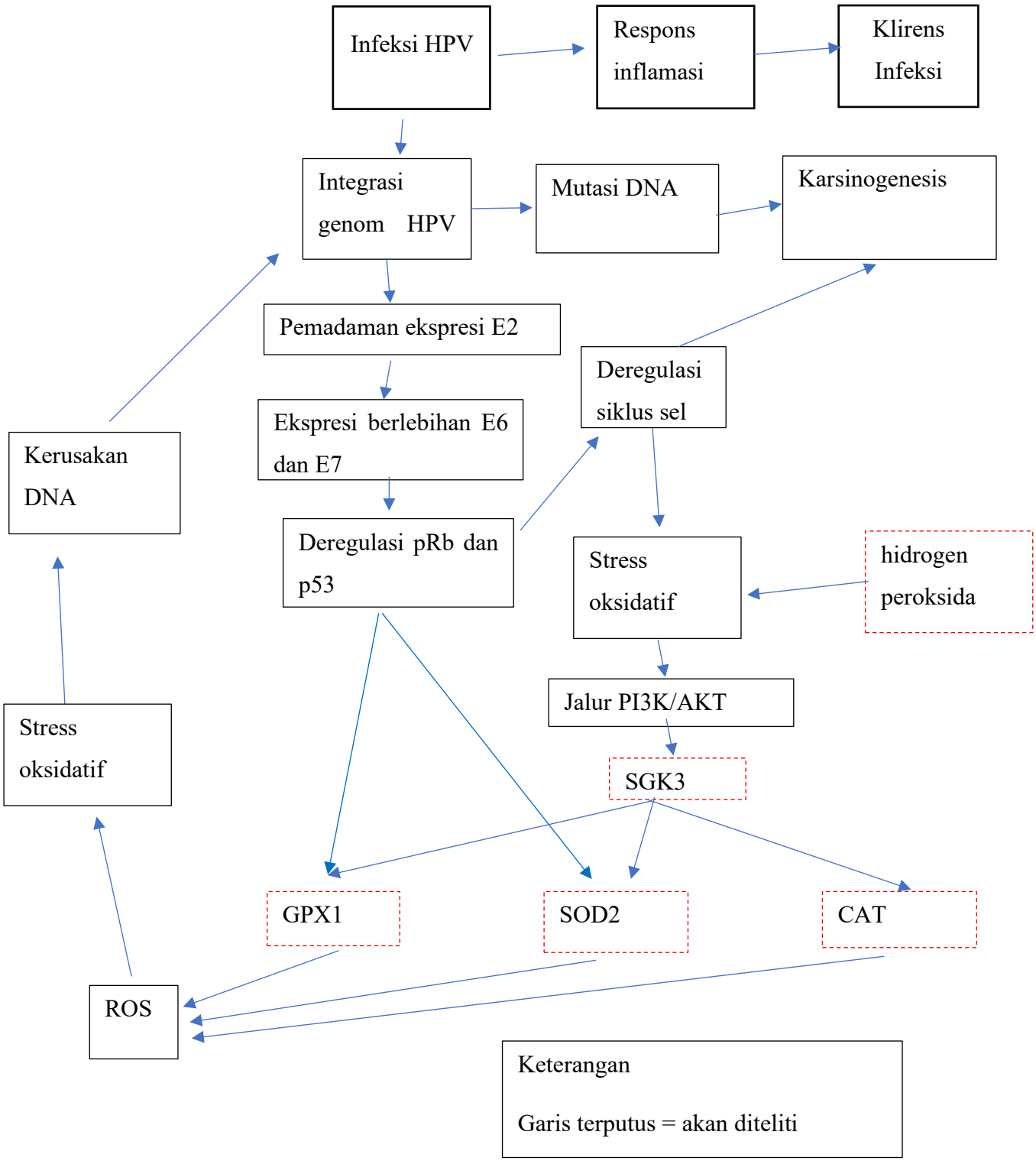
Dalam hal pengendalian stress oksidatif, SGK3 mungkin memiliki peran dalam memodulasi *catalase* secara langsung ataupun tidak langsung. SGK3 tidak mempengaruhi katalase secara transkripsi, melainkan ekspresi SGK3 melindungi katalase dari degradasi sehingga katalase dapat memiliki dampak yang lebih signifikan dalam menyeimbangkan homeostasis redoks dalam kanker serviks.[11]

2.2 Ringkasan pustaka

Tabel 1. Ringkasan pustaka

Peneliti	Lokasi & waktu	Desain	Subjek	Variabel yang diteliti	Lama	Hasil
Wang M *et al*[11]	China 2023	Eksperimental in vitro	*Cell line* SiHa, HeLa, ME180, HT-3, and HEK293T	*Signalling Axis* SGK3 dan CAT	-	Signalling Axis SGK3-CAT dapat ditargetkan dalam terapi kanker dengan mutasi *helical domain* PIK3CA. SGK3 dapat melakukan mediasi fungsi CAT melalui fosforilasi CAT pada Ser167.
Talarico MCR *et al*[31]	Brazil	Studi potong silang	63 pasien dengan karsinoma sel skuamosa serviks stadium 3B	Ekspresi SOD2, risiko rekurensi, mortalitas, *disease-free survival*, *overall survival*	-	Ekspresi SOD tinggi berhubungan dengan rekurensi ($p = 0.001$), *distant recurrence* ($p = 0.002$), dan kematian ($p = 0.005$). Pasien dengan ekspresi SOD2 tinggi memiliki jangka waktu *disease-free survival* yang lebih singkat ($p = 0.001$) dan *overall survival* ($p = 0.003$) yang juga lebih singkat dibandingkan dengan pasien dengan ekspresi SOD2 lebih rendah.
Zhang *et al*[10]	China	Eksperimental in vitro	Sel karsinoma epitel skuamosa serviks dan adenokarsinoma serviks	Proliferasi sel, level GSSG, level GSH, aktivitas SOD, aktivitas GPX, aktivitas CAT	-	Perlakuan meningkatkan aktivitas SOD, CAT, dan GPx secara signifikan pada kedua jenis sel ($p < 0.05$ atau 0.01)

2.3 Kerangka teori

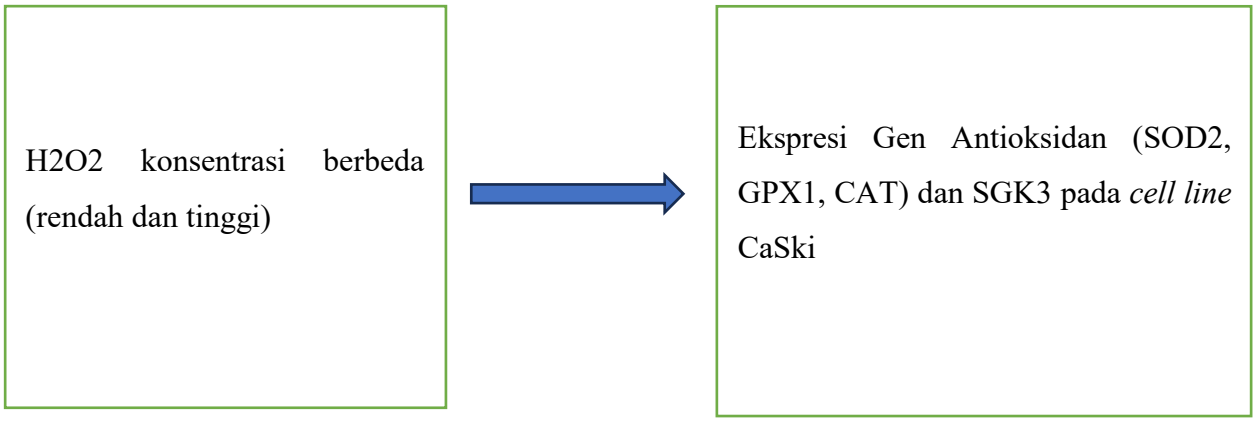


Gambar 1. Kerangka teori

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep

3.2 Variabel penelitian

3.2.1 Variabel tergantung

Variabel tergantung penelitian ini adalah tingkat ekspresi gen SOD2, GPx1, CAT, dan SGK3.

3.2.2 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah perlakuan dengan H_2O_2 (hidrogen peroksida) yang memiliki konsentrasi berbeda.

3.3 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara mengukur	Hasil	Skala	Referensi
SOD2	Gen antioksidan enzimatis	qPCR	Ekspresi SOD2	$2^{-\Delta\Delta CT}$	kontinu	Li *et al* [32]
GPX1	Gen antioksidan enzimatis	qPCR	Ekspresi GPX1	$2^{-\Delta\Delta CT}$	kontinu	Wang J *et al* [33]
CAT	Gen antioksidan enzimatis	*Quantitative reverse transcription* PCR	Ekspresi CAT	$2^{-\Delta\Delta CT}$	kontinu	Wang M *et al* [11]
SGK3	Anggota dari famili AGC *serine/threonine kinase* dan *merupakan downstream effector* dari *class I PI3K*	*Quantitative reverse transcription* PCR	Ekspresi SGK3	$2^{-\Delta\Delta CT}$	kontinu	Wang M *et al* [11]

H2O2 konsentrasi rendah dan tinggi	Larutan H_2O_2 (hidrogen peroksida) dengan konsentrasi 250 µM (rendah) dan 1000µM (tinggi)	konsentrasi	µM	Kategori	Zhang *et al* [10] ,Wang M *et al* [11]

BAB IV
METODE

4.1 Desain

Desain penelitian penelitian ini adalah studi eksperimental *in vitro* dengan menggunakan *cell line* CaSki.

4.2 Lokasi dan waktu

Penelitian akan dilakukan di laboratorium biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti Jl. Kyai Tapa No.1, RT.5/RW.9, Tomang, Kec. Grogol petamburan, Kota Jakarta Barat, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 11440 dan ProSTEM (Prodia Stem Cell Indonesia) Jl. Kramat VII No.11-13, RT.5/RW.1, Kenari, Kec. Senen, Kota Jakarta Pusat, Daerah Khusus Ibukota Jakarta 10430 dari bulan Agustus 2025 sampai Desember 2025.

4.3 Cara Penelitian

4.3.1 Sampel

Cell line CaSki dibeli dari *American Type Culture Collection* (ATCC) dan diautentikasi dengan *short tandem repeat* (STR) *profiling* di awal studi. Sel-sel dikultur dengan media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Media kultur disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum*. Sel-sel kemudian dikultur dalam incubator dengan 5% CO2 pada 37°C.[14]

4.3.2 Kriteria inklusi

-*Cell line* terautentifikasi ATCC.

-Jumlah sel hidup ditentukan dengan menilai *confluency* di mana *cell confluency* sebesar 80% (34). *Cell confluency* dapat diukur dengan program "Image J."[35]

4.3.3 Kriteria eksklusi

-Kontaminasi mikroba (bakteri, jamur, dan ragi) dapat diamati langsung dengan mata jika pada medium ditambahkan indikator pH *phenol red*. Selain itu, dapat dilakukan pengamatan dengan mikroskop (*light microscopy*).[36]

-Morfologi sel berubah.

4.3.4 *Harvest cell line*

-Sampel *cell line* yang dikoleksi (*harvest*) disimpan di dalam DNA/RNA Shield™

4.3.5 Ekstraksi RNA (*Total RNA Purification*)

-Tambahkan *RNA Lysis Buffer* pada sampel yang disimpan dalam DNA/RNA Shield™ dengan perbandingan 1:1 dan campur merata.

-Pindahkan sampel yang sudah dilisiskan dengan *RNA Lysis Buffer* ke filter *Spin-Away™* yang dimasukkan pada *collection tube* dan kemudian masukkan ke *centrifuge*.

-Simpan hasil *flow-through* yang ada pada *collection tube* untuk langkah selanjutnya.

-Tambahkan 1 volume etanol (95-100%) dengan perbandingan 1:1 pada hasil *flow-through* dan campur dengan baik.

-Campuran kemudian dipindahkan ke dalam *Zymo-Spin™ Column* yang diletakkan dalam *collection tube* dan kemudian sentrifus.

-Hasil *flow-through* dibuang.

-Tambahkan 400µl *RNA wash buffer* dan sentrifus

-Hasil *flow-through* dibuang.

-Pada tabung bebas *nuclease* tambahkan 5µl *DNase I* (1 U/µl), 75µ *DNA Digestion Buffer*, dan campur. Larutan kemudian dipindahkan ke matriks *column*.

-*Column* diinkubasi pada suhu ruang (20-30°C) selama 15 menit.

-Tambahkan 400µl *RNA Prep Buffer* dan sentrifus.

-Hasil *flow-through* pada *collection tube* dibuang

-Tambahkan 700µl *RNA Wash Buffer* pada *column* dan sentrifus

-Hasil *flow-through* pada *collection tube* dibuang

-Tambahkan 400µl *RNA Wash Buffer* dan sentrifus *column* selama 1 menit.

-Pindahkan *column* ke tabung bebas *nuclease* (*nuclease-free tube)*.

-Tambahkan 100µl *DNase/RNase-Free Water* langsung ke matriks *column* dan sentrifus.

4.3.6 Sintesis cDNA (*cDNA Synthesis*)

-Mengukur kualitas dan kuantitas RNA total menggunakan NanoPhotometer® N50 (Implen GmbH, Munich, Germany) dengan rasio *absorbance* 1.8 dalam 260/280λ dipilih sebagai nilai batas untuk kualitas sampel RNA yang baik.

-Sintesis sampel dari 100 ng RNA menggunakan ReverTra AceTM qPCR RT Master Mix dengan gDNA Remover (TOYOBO Inc., Kita-ku, Osaka, Japan).

-Campur DN-Master Mix, gDNA remover, dan nuclease-free water, dan kemudian tambahkan enzim reverse transcriptase.

-Campuran akhir diinkubasi menggunakan mesin PCR.

-Dilusi cDNA menggunakan RNA-free water menjadi satu per sepuluh konsentrasi awal.

4.3.7 *Quantitative Real-Time PCR*

-cDNA disiapkan dengan SensiFast™ SYBR® Lo-ROX Kit (Bioline, Memphis, Tennessee, USA) sesuai dengan instruksi produsen.

-Campuran untuk amplifikasi terdiri atas 2 µl cDNA 1:10, 0.4 µl *forward primer* dan *reverse primer* untuk gen target, dan 2.2 µl nuclease-free water.

-Analisis qPCR menggunakan *Rotor-Gene series 1.7 thermal cycler* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) pada suhu 95°C untuk 15 detik, kemmudian 60°C untuk 60 detik dan dilakukan 40 siklus.

-Nilai Ct didapatkan dengan aplikasi perangkat lunak Rotor-Gene 6000 (Q series; Qiagen GmbH, Hilden, Germany) pada *threshold* sebesar 0.05.

-Setiap sampel dianalisis minimal dua kali untuk memastikan akurasi dan kualitas dari hasil.

-*Melting curve* dianalisis setiap kali percobaan untuk memastikan spesifisitas produk PCR.

-Nilai Ct (*Ct values*) setiap ekspresi gen didapatkan dan dinormalisasi menggunakan nilai dari ekspresi GAPDH dengan rumus sebagai berikut:

$$2^{-ave\Delta Ct}$$

Keterangan: *Average Ct* = rata-rata dari hasil pengurangan cycle threshold gen antioksidan (SOD2, GPx1, CAT, SGK3) dengan GAPDH.

-Reaksi dilakukan secara duplo

4.4 Bahan dan instrumen

4.4.1 Bahan

-Bahan untuk *total RNA purification*.

- SensiFast™ SYBR® Lo-ROX Kit.

-Primer-primer untuk gen SOD2, GPX1, CAT, SGK3.

Tabel 3. Sekuens *primer*

No.	Gen	Sekuens *Primer*
1	SOD2 F	5′-GCCTCCCTGACCTGCCTTAC-3′
2	SOD2 R	5′-GTGATTGATATGGCCCCCG-3′
3	GPX1 F	5’-GTG CTC GGC TTC CCG TGC AAC-3’
4	GPX1 R	5’-CTC GAA GAG CAT GAA GTTGGG C-3’
5	CAT-*sense*	5′-CTGACTACGGGAGCCACAT-3′
6	CAT-*antisense*	5′-AGATCCGGACTGCACAAAGG-3′
7	SGK3-*sense*	5′-AATGCTGTATGGATTGCCTCCT-3′
8	SGK3- *antisense*	5′-GGCTGTAAGACTCACACTCCTGG-3′
9	GAPDH-*sense*	5′-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′
10	GAPDH-*antisense*	5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′

-H2O2 (hidrogen peroksida).

4.4.2 Alat

-*Centrifuge*.

-*Incubator*.

-*Vortex*.

-NanoPhotometer® N50 (Implen GmbH, Munich, Germany).

-Pipet dan *tips* pipet.

- *Rotor-Gene series 1.7 thermal cycler* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

4.5 Analisis statistik

4.5.1 Analisis univariat

Hasil-hasil pengukuran ekspresi gen akan dilakukan uji normalitas dengan tes Shapiro-Wilk kemudian disajikan dalam mean ± SD bila terdistribusi secara normal atau dalam bentuk median ± CI bila tidak terdistribusi secara normal.

4.5.2 Analisis Bivariat

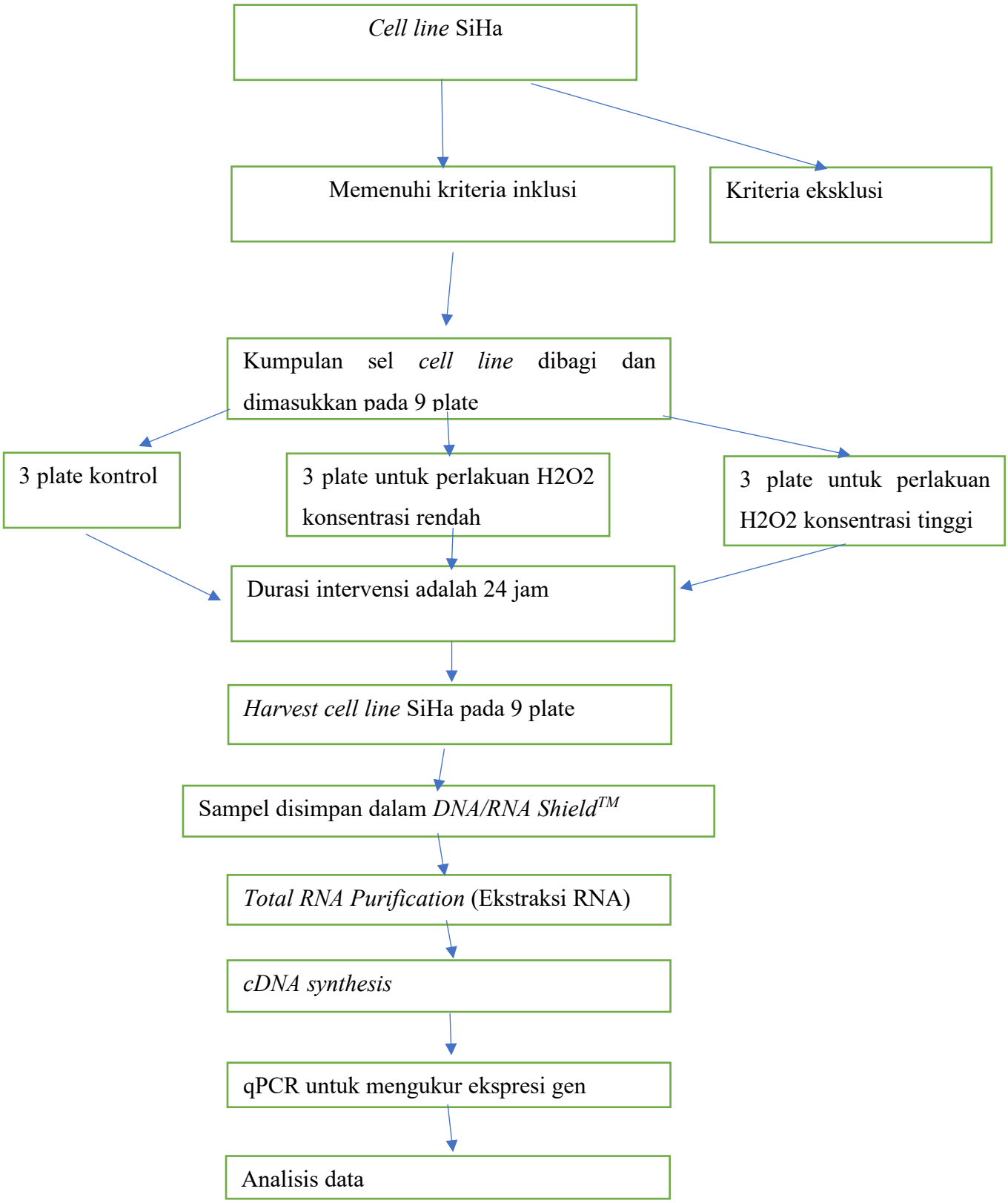
Data ekspresi gen antioksidan pada tingkat stress oksidatif berbeda akan dianalisis menggunakan uji *one-way ANOVA* dengan Dunnet's *post hoc test* bila terdistribusi secara normal dan tes Kruskal wallis bila tidak terdistribusi normal.

Tabel 4. *Dummy table* perbedaan ekspresi gen pada konsentrasi hidrogen peroksida tinggi dan rendah

No.	Ekspresi Gen	Kontrol	Konsentrasi Hidrogen Peroksida (H_2O_2)		Nilai p
			250 μM	1000 μM	
1	SOD2				
2	GPX1				
3	CAT				
4	SGK3				

Analisis data menggunakan uji *one-way analysis of variance* (ANOVA) Batas kemaknaan statistik yang digunakan $p<0,05$

4.6 Alur kerja penelitian



Gambar 3. Alur kerja

4.7 Etika penelitian

Penelitian ini akan dilakukan setelah lolos kaji etik Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.

4.8 Penjadwalan penelitian

Tabel 5. Penjadwalan pelaksanaan penelitian

Kegiatan	WAKTU											
	Feb 2025		Mar 2025		April 2025		Mei 2025		Juni 2025		Juli 2025	
Pemilihan judul												
Penyusunan dan penyelesaian BAB I **(Pendahuluan)**												
Penyusunan dan penyelesaian BAB II (**Tinjauan Pustaka)**												
Penyusunan dan penyelesaian BAB III **(Kerangka konsep & definisi operasional)**												
Penyusunan dan penyelesaian BAB IV **(Metode)**												
Persiapan ujian												

DAFTAR PUSTAKA

1. Ong SK, Abe SK, Thilagaratnam S, Haruyama R, Pathak R, Jayasekara H, et al. Towards elimination of cervical cancer – human papillomavirus (HPV) vaccination and cervical cancer screening in Asian National Cancer Centers Alliance (ANCCA) member countries. Lancet Reg Health - West Pac [Internet]. 2023 Oct [cited 2025 Jun 6];39:100860. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2023.100860

2. Park E, Kim JY, Choi S, Kim DS, Oh YL. Carcinogenic risk of human papillomavirus (HPV) genotypes and potential effects of HPV vaccines in Korea. Sci Rep [Internet]. 2019 Aug 29 [cited 2025 Jun 6];9(1):12556. DOI: 10.1038/s41598-019-49060-w

3. Setiawan D, Ramadani P, Lianawati L, Galistiani G. HPV Vaccination Program in Indonesia: Effectiveness, Dose, Scale-Up Costs, Future Prospects, and Policy Recommendations. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2025 Feb 1 [cited 2025 Jun 6];26(2):421–34. DOI: 10.31557/APJCP.2025.26.2.421

4. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. Front Microbiol [Internet]. 2018 Nov 28 [cited 2025 Feb 23];9:2896. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02896

5. Crusz SM, El-Shakankery K, Miller RE. Targeting HPV in gynaecological cancers – Current status, ongoing challenges and future directions. Womens Health [Internet]. 2020 Jan [cited 2025 Jun 6];16:1745506520961709. DOI: 10.1177/1745506520961709

6. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2017 [cited 2025 Feb 23];44(2):532–53. DOI: 10.1159/000485089

7. Preci DP, Almeida A, Weiler AL, Mukai Franciosi ML, Cardoso AM. Oxidative damage and antioxidants in cervical cancer. Int J Gynecol Cancer [Internet]. 2021 Feb [cited 2025 May 10];31(2):265–71. DOI: 10.1136/ijgc-2020-001587

8. Nandi A, Yan LJ, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:9613090. DOI: 10.1155/2019/9613090

9. Molavian H, Madani Tonekaboni A, Kohandel M, Sivaloganathan S. The Synergetic Coupling among the Cellular Antioxidants Glutathione Peroxidase/Peroxiredoxin and Other Antioxidants and its Effect on the Concentration of H2O2. Sci Rep [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2025 Feb 23];5(1):13620. DOI: 10.1038/srep13620

10. Zhang P, Yin H, Wang S, Wei Y, Peng N, Bi W, et al. Different effects of H2O2 treatment on cervical squamous carcinoma cells and adenocarcinoma cells. Arch Med Sci AMS. 2015 Dec 10;11(6):1308–13. DOI: 10.5114/aoms.2015.56356

11. Wang M, Liu J, Liao X, Yi Y, Xue Y, Yang L, et al. The SGK3-Catalase antioxidant signaling axis drives cervical cancer growth and therapy resistance. Redox Biol [Internet]. 2023 Nov [cited 2025 Feb 23];67:102931. DOI: 10.1016/j.redox.2023.102931

12. Souza RP, Bonfim-Mendonça PDS, Gimenes F, Ratti BA, Kaplum V, Bruschi ML, et al. Oxidative Stress Triggered by Apigenin Induces Apoptosis in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer-Derived Cell Lines. Saso L, editor. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2017 Jan [cited 2025 Jul 9];2017(1). DOI: 10.1155/2017/1512745

13. Zuñiga Martinez MDL, López Mendoza CM, Tenorio Salazar J, García Carrancá AM, Cerbón Cervantes MA, Alcántara-Quintana LE. Establishment, authenticity, and characterization of cervical cancer cell lines. Mol Cell Oncol [Internet]. 2022 Dec 31 [cited 2025 Jun 6];9(1):2078628. DOI: 10.1080/23723556.2022.2078628

14. Ortiz-Pedraza Y, Muñoz-Bello JO, Ramos-Chávez LA, Martínez-Ramírez I, Olmedo-Nieva L, Manzo-Merino J, et al. HPV16 E6 and E7 Oncoproteins Stimulate the Glutamine Pathway Maintaining Cell Proliferation in a SNAT1-Dependent Fashion. Viruses [Internet]. 2023 Jan 24 [cited 2025 Jul 7];15(2):324. DOI: 10.3390/v15020324

15. Wulandari D, Meidyandra RW, Andrijono. Genotype profiles of high-risk human papillomavirus in women of reproductive age: A community-based study. Serra N, editor. PLOS ONE [Internet]. 2023 Jul 17 [cited 2025 Jul 7];18(7):e0287399. DOI: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0287399

16. Xiong L, Garfinkel A. A common pathway to cancer: Oncogenic mutations abolish p53 oscillations. Prog Biophys Mol Biol [Internet]. 2022 Oct [cited 2025 Feb 25];174:28–40. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2022.06.002

17. Li Q, Xie B, Chen X, Lu B, Chen S, Sheng X, et al. SNORD6 promotes cervical cancer progression by accelerating E6-mediated p53 degradation. Cell Death Discov [Internet]. 2023 Jun 27 [cited 2025 Feb 25];9(1):192. DOI: 10.1038/s41420-023-01488-w

18. Yapindi L, Bowley T, Kurtaneck N, Bergeson RL, James K, Wilbourne J, et al. Activation of p53-regulated pro-survival signals and hypoxia-independent mitochondrial targeting of TIGAR by human papillomavirus E6 oncoproteins. Virology [Internet]. 2023 Aug [cited 2025 Feb 25];585:1–20. DOI: 10.1016/j.virol.2023.05.004

19. Gravitt P, Winer R. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. Viruses [Internet]. 2017 Sep 21 [cited 2025 Mar 4];9(10):267. DOI: 10.3390/v9100267

20. Ca Ski [Internet]. https://www.atcc.org. [cited 2025 Jul 9]. Available from: https://www.atcc.org/products/crl-1550.

21. CaSki cells [Internet]. Cytion. [cited 2025 Jul 9]. Available from: https://www.cytion.com/CaSki-Cells/300145.

22. Zhao Y, Wang H, Zhou J, Shao Q. Glutathione Peroxidase GPX1 and Its Dichotomous Roles in Cancer. Cancers [Internet]. 2022 May 23 [cited 2025 Feb 23];14(10):2560. DOI: 10.3390/cancers14102560

23. Miar A, Hevia D, Muñoz-Cimadevilla H, Astudillo A, Velasco J, Sainz RM, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. Free Radic Biol Med [Internet]. 2015 Aug [cited 2025 Feb 23];85:45–55. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.001

24. Kizhuveetil U, Omer S, Karunagaran D, Suraishkumar GK. Improved redox anti-cancer treatment efficacy through reactive species rhythm manipulation. Sci Rep [Internet]. 2020 Jan 31 [cited 2025 Jul 3];10(1):1588. DOI: 10.1038/s41598-020-58579-2

25. Pei J, Pan X, Wei G, Hua Y. Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxidation. Front Pharmacol [Internet]. 2023 Mar 2 [cited 2025 May 12];14:1147414. DOI: 10.3389/fphar.2023.1147414

26. Jomova K, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Arch Toxicol [Internet]. 2024 May [cited 2025 May 12];98(5):1323–67. DOI: 10.1007/s00204-024-03696-4

27. Hou M, Lai Y, He S, He W, Shen H, Ke Z. SGK3 (CISK) may induce tumor angiogenesis (Hypothesis). Oncol Lett [Internet]. 2015 Jul [cited 2025 Feb 25];10(1):23–6. DOI: 10.3892/ol.2015.3182

28. Cicenas J, Meskinyte-Kausiliene E, Jukna V, Rimkus A, Simkus J, Soderholm D. SGK1 in Cancer: Biomarker and Drug Target. Cancers [Internet]. 2022 May 12 [cited 2025 Feb 25];14(10):2385. DOI: 10.3390/cancers14102385

29. Yuan L, Cai Y, Wang G, Liu X, Chen B, Zhou D, et al. SGK3 promotes estrogen receptor-positive breast cancer proliferation by activating STAT3/ZMIZ2 pathway to stabilise β-catenin. Br J Pharmacol [Internet]. 2025 Jan 28 [cited 2025 Feb 25];bph.17453. DOI: 10.1111/bph.17453

30. Xu N, Li LS, Li H, Zhang LH, Zhang N, Wang PJ, et al. SGK3 overexpression correlates with a poor prognosis in endoscopically resected superficial esophageal squamous cell neoplasia: A long-term study. World J Gastroenterol [Internet]. 2023 Jun 21 [cited 2025 Feb 25];29(23):3658–67. DOI: 10.3748/wjg.v29.i23.3658

31. Talarico MCR, Nunes RAL, Silva GÁF, Costa LBED, Cardoso MR, Esteves SCB, et al. High Expression of SOD2 Protein Is a Strong Prognostic Factor for Stage IIIB Squamous Cell Cervical Carcinoma. Antioxidants [Internet]. 2021 May 5 [cited 2025 May 27];10(5):724. DOI: 10.3390/antiox10050724

32. Li J, Liu Y, Liu Q. [Expression of superoxide dismutase 2 in breast cancer and its clinical significance]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2020 Aug 30;40(8):1103–11. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2020.08.06

33. Wang J, Shen P, Liao S, Duan L, Zhu D, Chen J, et al. Selenoprotein P inhibits cell proliferation and ROX production in HCC cells. Ogunwobi O, editor. PLOS ONE [Internet]. 2020 Jul 31 [cited 2025 May 27];15(7):e0236491. DOI: 10.1371/journal.pone.0236491

34. Nare Z. Cell confluency: Why it matters and 3 easy methods [Internet]. Bitesize Bio. Science Squared Ltd.; 2022 [cited 2025 Jul 8]. Available from: https://bitesizebio.com/63887/cell-confluency/.

35. cellculture. Methods to estimate cell confluency [Internet]. Cellculture2. 2024 [cited 2025 Jul 9]. Available from: https://cellculture2.altervista.org/methods-to-estimate-cell-confluency/.

36.Sigmaaldrich.com. [cited 2025 Jul 9]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/ID/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-culture-troubleshooting-contamination.

37. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. Biochem Medica [Internet]. 2021 Feb 15 [cited 2025 Jul 8];31(1):27–53. DOI: 10.11613/bm.2021.010502