PERUBAHAN EKSPRESI GEN *SIRTUIN 1* PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN H_2O_2

PROPOSAL SKRIPSI

Disusun Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan

Mencapai Derajat Sarjana Kedokteran

Janice Puteri Satibi

NIM : 030002200081

UNIVERSITAS TRISAKTI

FAKULTAS KEDOKTERAN

JAKARTA, JUNI, 2025

Bidang Ilmu : Biomolekular Klinik

PROPOSAL SKRIPSI

PERUBAHAN EKSPRESI GEN *SIRTUIN 1* PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN H_2O_2

Disusun Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan

Mencapai Derajat Sarjana Kedokteran

Janice Puteri Satibi

NIM : 030002200081

UNIVERSITAS TRISAKTI

FAKULTAS KEDOKTERAN

JAKARTA, JUNI, 2025

PERSETUJUAN

Proposal Skripsi

Judul:

PERUBAHAN EKSPRESI GEN *SIRTUIN 1* PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN H_2O_2

Nama mahasiswa: Janice Puteri Satibi

NIM 030002200081

Telah disetujui untuk diuji di hadapan

Tim Penguji Proposal Skripsi

Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

Pada Hari Jumat , Tanggal 13 Juni 2025

Pembimbing

(dr. Monica Dwi Hartanti, M.Biomed, Ph.D)

NIK 2903/USAKTI

PENGESAHAN PROPOSAL SKRIPSI

Judul:

PERUBAHAN EKSPRESI GEN *SIRTUIN 1* PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN H_2O_2

Nama mahasiswa: Janice Puteri Satibi

NIM 030002200081

Telah diuji dan disahkan di hadapan **Dewan Penguji Skripsi** Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

Pada Hari Senin, Tanggal 30 Juni 2025

Ketua Penguji

Nama : .....

NIK :

Anggota Penguji 1

Nama : .....

NIK :

Anggota Penguji 2

Nama : .....

NIK :

Jakarta, 30 Juni 2025
Dekan FK Trisakti

Dr. dr. Yenny, Sp. FK
NIK 2613/USAKTI

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama	: Janice Puteri Satibi
NIM	: 030002200081
Program Studi	: Pendidikan Kedokteran
Alamat Korespondensi	: Jl. Atlanta 1 No. 55 Kota Jakarta Baarat, Kembangan, DKI Jakarta, 11610
Telepon / mobile E-mail	: 087776392951 / 030002200081@std.trisakti.ac.id
Judul skripsi	: PERUBAHAN EKSPRESI GEN *SIRTUIN 1* PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN H_2O_2

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 pustaka.

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, 30 Juni 2025
Peneliti

Janice Puteri Satibi
NIM 030002200081

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas kasih dan penyertaan-Nya yang melimpah, sehingga penulisan proposal skripsi ini dapat terselesaikan sebagai salah satu persyaratan untuk meraih gelar sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Judul proposal ini adalah *" PERUBAHAN EKSPRESI GEN SIRTUIN 1 PADA SEL CaSki YANG DIBERIKAN* H_2O_2." Tanpa anugerah dan kekuatan dari-Nya, mustahil penulis dapat menyelesaikan tahap ini. Penulis juga menyadari bahwa penyusunan proposal ini tidak terlepas dari dukungan, doa, dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan tulus hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. dr. Yenny, Sp.FK, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.
2. dr. Monica Dwi Hartanti, M.Biomed, Ph.D, selaku dosen pembimbing yang dengan tulus meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk membimbing serta memberikan arahan dalam penyusunan proposal ini.
3. Ayahanda Ir. Ade Bunawan M.M dan Ibunda Thong Jenny S.E , yang senantiasa mendoakan, mendukung, dan memberikan kasih sayang tanpa henti selama proses penulisan.
4. Rekan-rekan dan semua pihak yang turut berkontribusi dalam perencanaan, pelaksanaan, hingga penyelesaian proposal ini.

Semoga Tuhan Yesus membalas setiap kebaikan yang telah diberikan. Penulis berharap proposal ini menjadi langkah awal yang baik untuk penelitian selanjutnya dan memberikan manfaat bagi dunia kedokteran serta masyarakat luas.

Jakarta, 30 Juni 2025
Peneliti

Janice Puteri Satibi

NIM 030002200081

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING ii
HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI DAN DEKAN iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN iv
KATA PENGANTAR v
DAFTAR ISI vi
DAFTAR GAMBAR viii
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR LAMPIRAN x
DAFTAR SINGKATAN xi

BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar belakang 1
1.2 Perumusan masalah 4
1.3 Tujuan 4
1.3.1 Tujuan umum 4
1.3.2 Tujuan khusus 4
1.4 Hipotesis 4
1.5 Manfaat 4
1.5.1 Bagi pengembangan ilmu pengetahuan 4
1.5.2 Bagi profesi 5
1.5.3 Bagi masyarakat 5

BAB II TINJAUAN, RINGKASAN PUSTAKA, KERANGKA TEORI 6
2.1 Tinjauan pustaka 6
2.1.1 Klasifikasi *Human Papillomavirus* : *high-risk* dan *low Risk* 6
2.1.2 Epidemiologi dan karakteristik kanker serviks 6
2.1.3 Mekanisme onkogenik *Human Papillomavirus* dalam kanker serviks 7
2.1.4 CaSki *cervical cancer cell line* 8
2.1.5 Peran SIRT1 dalam regulasi siklus sel dan apoptosis 9
2.1.6 Peran SIRT1 dengan jalur onkogenik HPV 9
2.1.7 Ekspresi SIRT1 pada sel kanker serviks yang terinfeksi HPV 10
2.1.8 Mekanisme **H2O2** pada tubuh manusia 10
2.2 Ringkasan pustaka 13
2.3 Kerangka teori 15

BAB III KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL 16
3.1 Kerangka konsep 16
3.2 Variabel penlitian 16
3.2.1 Variabel tergantung 16

3.2.2 Variabel bebas 16
3.3 Definisi operasional 17

BAB IV METODE 18
4.1 Desain penelitian 18
4.2 Lokasi dan waktu penelitian 18
4.3 Sampel 18
4.3.1 Kriteria pemilihan sampel 19
4.4 Bahan dan instrumen penelitian 19
4.4.1 Bahan 19
4.4.2 Instrumen penelitian 20
4.5 Metode 21
4.5.1 Kultur CaSki *cervical cancer cell line* 21
4.5.2 Pembuatan **H2O2** konsentrasi 250 µM dan 1000 µM 22
4.5.3 Preparasi sampel/jaringan 23
4.5.4 Total RNA *purification* 23
4.5.5 Prosedur sintesis cDNA 24
4.5.6 Prosedur 2-*step Quantitative real-time* PCR 25
4.6 Analisis data 25
4.6.1 Analisis univariat 25
4.6.2 Analisis bivariat 26
4.7 Alur kerja penelitian 27
4.8 Etika penelitian 27
4.9 Penjadwalan penelitian 28
4.10 Biaya penelitian 29

DAFTAR PUSTAKA 30
LAMPIRAN 34

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Ilustrasi proses replikasi HPV dengan peran onkogen beserta peran SIRT1 pada onkogenesis kanker serviks 10
Gambar 2. Kerangka teori 15
Gambar 3. Kerangka konsep 16
Gambar 4. Alur kerja 27

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Ringkasan pustaka 13
Tabel 2. Definisi operasional 17
Tabel 3. Komponen *master mix* 20
Tabel 4. Sekuens primer untuk gen SIRT1 dan GADPH yang akan digunakan pada penelitian[36] 20
Tabel 5. *Dummy table* perbedaan ekspresi gen *SIRT1* pada 3 kelompok dengan pemberian H2O2 26
Tabel 6. Penjadwalan pelaksanaan penelitian 28
Tabel 7. Rincian perkiraan pengeluaran penelitian 29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Contoh sertifikat STR (Short Tandem Repeat) profiling 34

DAFTAR SINGKATAN

AIM 2	: *Absent in Melanoma 2*
APC	: *Antigen presenting cell*
ARS	: Antioxidant and redox signalling
CIN	: *Cervical Intraepithelial Neoplasia*
DMEM	: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
FCS	: *Fetal calf serum*
FOXO1	: *Forkhead box O1*
HDAC	: *Histone deacetylase*
HPV	: *Human Papilloma Virus*
IFN-γ	: *Interferon gamma*
IL-10	: *Interleukin-10*
IL-1β	: *Interleukin -1 beta*
MHC	: *Major histocompatibility complex*
MRP	: *Multidrug resistance protein*
NAD	: *Nicotinamide adenine dinucleotide*
NF-κB	: *Nuclear Factor Kappa-B*
P-gp	: *P-glycoprotein*
PBS	: *Phosphate buffered saline*
pRb	: *Protein Retinoblastoma*
ROS	: *Reactive oxygen species*
SCC	: *Squamous cell carcinoma*
SIRT1	: *Sirtuin 1*
TGF- β	: *Transforming growth factor beta*
TLRs	: *Toll-like receptors*
TNF- α	: *Tumor necrosis factor alfa*

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), di tahun 2022 kanker serviks merupakan kanker keempat yang paling umum terjadi pada wanita. Jumlah kejadian kasus baru pada tahun 2022 adalah sekitar 660.000.[1,2] Sembilan puluh empat persen dari total kematian yang disebabkan oleh kanker serviks (350.000) pada tahun 2022 terjadi di negara dengan pendapatan rendah dan sedang seperti di negara berkembang.[1] Kanker serviks merupakan penyakit yang hampir semua kasusnya disebabkan oleh infeksi *high risk Human Papilloma Virus* atau HPV, HPV merupakan virus DNA untai ganda tanpa selubung. Transmisi HPV dapat terjadi melalui kontak kulit dan infeksi menular secara seksual yang dapat dicegah.[3] Sampai saat ini sekitar 227 tipe HPV telah ditemukan pada manusia.[4] HPV dapat dibagi menjadi 2 tipe secara garis besar, yaitu *high-risk* dan *low-risk*. HPV *high-risk* berperan dalam onkogenesis kanker serviks, tipe HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, dan HPV-73 adalah tipe-tipe HPV yang bersifat onkogenik & *high-risk* yang terasosiasi dengan terjadinya kanker serviks.[4,5] *Low-risk* HPV meliputi HPV-6 dan HPV-11 yang hanya menimbulkan lesi jinak dan merupakan lesi yang *self-limiting*.[4]

Angka kejadian tingkat infeksi HPV secara global menunjukan bahwa tipe HPV-16 memiliki tingkat infeksi tertinggi, HPV-18 menduduki peringkat kedua, diikuti dengan HPV-33, HPV-53, dan HPV-58.[5] Proses onkogenesis yang terjadi dalam kanker serviks bermula dari proses infeksi virus *high-risk* HPV dengan mikro abrasi yang melewati lapisan basal sel skuamosa dari *host*. Berikutnya terjadi proses integrasi DNA virus ke *host* dengan alterasi genetik menggunakan onkogen yang menurunkan aktivitas *tumor suppressor gene* sehingga virus dapat melakukan replikasi DNA dan mengubah fungsi sel *host*. HPV juga menghindari sistem imun alamiah *host* agar proses replikasi dapat berjalan sehingga virus secara persisten menginfeksi sel *host*, kondisi ini dapat membuat pertumbuhan sel yang irregular

dan tidak teratur atau disebut sebagai *cervical intraepithelial neoplasia* 1atau CIN 1. Jika tidak membaik makan akan berkembang menjadi CIN 2/3 dalam 2-3 tahun, dalam 10-12 tahun lesi pre kanker akan bertranformasi menjadi karsinoma yang invasif.[6]

CaSki *cervical cancer cell line* merupakan sebuah lini sel dengan tipe karsinoma sel skuamosa atau *epidermoid carcinoma* pada sel jaringan serviks uteri yang mengandung 600 salinan HPV-16 yang terintegrasi dalam sel.[7–9] Pemilihan lini sel ini didasarkan karena merupakan model in vitro yang relevan untuk kanker serviks yang banyak ditemukan secara global, dimana CaSki *cervical cancer cell line* ini berasal dari kanker serviks manusia yang mengandung DNA *Human Papillomavirus* (HPV) tipe 16, tipe HPV yang paling sering dikaitkan dengan kejadian infeksi secara global.

Hidrogen peroksida atau H_2O_2 dalam konteks penelitian ini mengarah ke ranah stress oksidatif yang tergambar dalam *reactive oxygen species*. H_2O_2 berasal perubahan anion superoksida o^{2-} atau oksigen bebas dalam intrasel oleh superoksida dismutase, oksigen bebas dalam kadar yang tinggi dapat menyebabkan apoptosis atau formasi kanker.[10] Sebuah hasil penelitian oleh Zhang P *et al*.[10] menemukan bahwa pemberian H_2O_2 pada SiHa *cervical cancer cell line* menghambat proliferasi *cell line* tersebut, dimana lini sell tersebut sama-sama mengandung HPV-16 dan merupakan tipe kanker serviks karsinoma sel skuamosa seperti CaSki *cell line* .[10] Pengunaan H_2O_2 sering digunakan pada penelitian untuk mewakilkan stress oksidatif, dikarenakan H_2O_2 sering di manfaatkan sebagai model stress oksidatif karena menghasilkan radikal hidroksil (OH) melalui reaksi Fenton yaitu reaksi antara H_2O_2 dengan ion Fe^{2+}. Radikal hidroksil merupakan *reactive oxygen species* yang sangat reaktif dan mampu merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan membran lipid. Reaksi katalase juga terjadi dengan pemberian H_2O_2 juga meningkatkan konsentrasi O_2 intrasel dan menginduksi produksi oksigen radikal secara endogen sehingga memicu kerusakan sel.[11]

SIRT1 atau *Sirtuin 1* merupakan sebuah antioksidan, namun dengan kondisi stress oksidatif terjadi deregulasi transkripsi SIRT1, mengakibatkan fungsi SIRT1 menurun dan kehilangan fungsi protektif selularnya.[12] Peran SIRT1 pada

perkembangan kanker dalam keseluruhan merupakan topik kontroversial, pada formasi kanker kolon dan karsinoma sel skuamosa di kepala & leher SIRT1 mempunyai peran tumor *suppressor*.[13] Penelitian oleh Veles-Perez A *et al.*[14] dan Singh S *et al.*[15] mengungkapkan bahwa terjadi overekspresi SIRT1 pada neoplasia intraepitel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa pada kanker serviks menunjukan peran SIRT1 dalam pertumbuhan tumor.[13–15] SIRT1 adalah komponen tambahan dalam onkogen E1-E2 dalam proses replikasi DNA virus HPV, dengan onkogen E6-E7 menginhibisi apoptosis dengan mendegradasi *tumor suppressor gene* p53 dan *protein retinoblastoma* (pRb) sehingga infeksi persisten dan proliferasi sel tumor terjadi.[16] SIRT1 juga turun berperan dalam mensupresi transkripsi AIM2 dan *interleukin* yang menurunkan inflamasi dan kematian sel, sehingga sel yang telah terinfeksi virus HPV dapat menghindari sistem imun alamiah.[16]

Studi telah menunjukan bahwa SIRT1 meningkatkan ekspresi *multidrug resistance protein* (MRP) pada membran sel sehingga terjadi effluks obat kemoterapi, juga mentransfer *Forkhead box O1* terdeasetilasi, P-glikoprotein (P-gp), dan *Multidrug resistance protein* ke sel tetangga yang berkontribusi pada transformasi dan penyebaran resistensi kemoterapi. *SIRT1* juga meninaktivasi p53 yang mencegah apoptosis sehingga pertumbuhan sel tumor tetap bertahan dari kemoterapi[16–18].

Penelitian ini ingin menggali lagi pengetahuan mengenai *Sirtuin 1* dikarenakan eratnya hubungan gen tersebut pada proses onkogenesis kanker serviks[16], sehingga cocok digunakan sebagai gen target pengobatan. Penggunaan H_2O_2 yang mewakilkan pemberian stress oksidatif kepada sel digunakan karena sifat H_2O_2 sebagai *reactive oxygen species* yang kuat dan menghasilkan hasil yang efektif serta kemudahan untuk membuat larutan tersebut membuat H_2O_2 sebagai opsi yang baik. H_2O_2 sebagai stres oksidatif memiliki peran ganda yang kompleks , stres oksidatif dapat memicukan transformasi kearah *malignant*, angiogenesis, proliferasi,& metastasis dalam kanker[19]. Namun juga memiliki peran inhibisi proliferasi pada kanker apabila dengan jumlah yang tinggi seperti pada penelitian dengan SiHa *cervical cancer cell line*[10], dengan meneliti hubungan pemberian H_2O_2 terhadap ekspresi SIRT1 dalam CaSki *cell line* peneliti mengharapkan

menemukan suatu hubungan sehingga hasil dapat dikembangkan untuk mencari metode target pengobatan untuk kanker serviks karsinoma sel skuamosa yang baru.

1.2 Perumusan masalah

Apakah terdapat pebedaan ekspresi gen SIRT1 setelah pemberian H_2O_2 pada CaSki *cervical cancer cell line* ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengembangkan pengetahuan mengenai SIRT1 sebagai target pengobatan baru melalui analisa perubahan ekspresi gen SIRT1 setelah pemberian H_2O_2 secara *in vitro*. Untuk meningkatkan pengetahuan mengenai hubungan H_2O_2 dan SIRT1 pada proses onkogenesis serta inhibisi proliferasi sel pada kanker serviks tipe karsinoma sel skuamosa.

1.3.2 Tujuan khusus

- Untuk menganalisa perbedaan ekspresi gen SIRT1 pada CaSki *cervical cancer cell line*, antara yang control dan yang diberikan intervensi H_2O_2.

1.4 Hipotesis

- Terdapat perbedaan ekspresi gen SIRT1 pada CaSki *cervical cancer cell line* antara kontrol dengan yang diberikan dosis H_2O_2 yang berbeda.

1.5 Manfaat

1.5.1 Bagi pengembangan ilmu pengetahuan

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan mengenai metode untuk mensupresi SIRT1 dalam onkogenesis dan proliferasi sel kanker serviks pada CaSki *cervical cancer cell line*. Sehingga dapat menambah pengetahuan mengenai potensi pemberian H_2O_2 guna menurunkan ekspresi SIRT1 sehingga dapat dijadikan bahan acuan untuk perkembangan metode pengobatan serta peran SIRT1 sebagai target gen

untuk pengembangan metode pengobatan pada kanker serviks tipe karsinoma sel skuamosa.

1.5.2 Bagi profesi

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat membantu menemukan pengembangan metode pengobatan baru dalam upaya menyembuhkan pasien kanker serviks dengan tipe karsinoma sel skuamosa, serta berkontribusi dalam pengembangan ilmu kedokteran dan teknologi medis di masa yang mendatang.

1.5.3 Bagi masyarakat

Masyarakat, terlebihnya para pasien pengidap kanker serviks dengan tipe karsinoma sel skuamosa diharapkan dapat memperoleh metode pengobatan yang baru.

BAB II
TINJAUAN, RINGKASAN PUSTAKA, KERANGKA TEORI

2.1 Tinjauan pustaka

2.1.1 Klasifikasi *Human Papillomavirus* : *high-risk* dan *low Risk*

Human Papillomavirus atau HPV merupakan virus DNA yang beruntai ganda dan dapat menginfeksi sel epitel dan sel kelenjar manusia. Infeksi oleh virus tersebut dapat menimbulkan baik lesi jinak dan kanker pada mukosa atau kulit.[4] Sampai saat ini sekitar 227 tipe HPV telah ditemukan pada manusia, dari total semua tipe hanya sekitar 40 tipe saja yang bertanggung jawab dalam onkogenesis pada kanker serviks.[4] HPV manusia dibagi menjadi 2 kategori besar yaitu *high-risk* dan *low-risk* HPV. HPV *high-risk* berperan dalam onkogenesis kanker serviks, tipe HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68,dan HPV-73 adalah tipe-tipe HPV yang bersifat onkogenik & *high-risk* yang terasosiasi dengan terjadinya kanker serviks[4,5]. *Low-risk* HPV meliputi HPV-6 dan HPV-11 yang hanya menimbulkan lesi jinak dan merupakan lesi yang *self-limiting*[4].

2.1.2 Epidemiologi dan karakteristik kanker serviks

Berdasarkan data *World Health Organization* (WHO), di tahun 2022 kanker serviks merupakan kanker keempat yang paling umum terjadi pada wanita. Jumlah kejadian kasus baru pada tahun 2022 adalah sekitar 660.000 [1,2]. Angka kejadian tingkat infeksi HPV secara global menunjukan bahwa tipe HPV-16 memiliki tingkat infeksi tertinggi, HPV-18 menduduki peringkat kedua, diikuti dengan HPV-33, HPV-53, dan HPV-58.[5] Laporan *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) pada 2022 menunjukan prevalensi kanker serviks uteri di negara Asia Tenggara berada di 63,8/100.000 populasi dengan prevalensi 217.614 kasus dalam 5 tahun.[20] Data GLOBOCAN menunjukan kanker serviks menduduki tingkat ke 2 pada wanita indonesia , prevalensi kanker serviks uteri di Indonesia berada di 87,2/100.000 populasi dengan total 120.940 kasus dalam 5 tahun [21]. Vet, JNI *et al.* [22] di tahun 2008 menemukan prevalensi infeksi tipe HPV di 3 regio Indonesia yaitu Jakarta, Tasikmalaya, dan Bali. Data menunjukan prevalensi tipe HPV yang paling

umum ditemukan adalah HPV-52 (23,2%), HPV-16 (18%), HPV-18 (16,1%), dan HPV-39 (11,8%).[22]

2.1.3 Mekanisme onkogenik *Human Papillomavirus* dalam kanker serviks

Proses onkogenesis yang terjadi dalam kanker serviks bermula dari proses infeksi virus *high-risk Human Papillomavirus* (HPV) dengan mikro lesi atau abrasi yang melewati lapisan basal dari *host*. Berikutnya terjadi proses integrasi DNA virus ke *host* dengan alterasi genetik dengan onkogen yang menurunkan aktivitas *tumor suppressor gene* sehingga virus dapat melakukan replikasi DNA dan mengubah fungsi sel *host*. Onkogen yang berperan adalah E1-E2 untuk inisiasi transkripsi, E4 mendisrupsi lapisan atas filamen keratin dari epitelium. E5 berfungsi untuk menginduksi proliferasi sel, angiogenesis, dan apoptosis. E6 berfungsi dalam penghindaran apoptosis dan deregulasi siklus sel, E7 meningkatkan proliferasi tak terkendali dan juga bekerjasama dengan E6 untuk menginduksi transformasi sel kerarah malignan.[4,23]

Progesivitas *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN) dan kanker serviks disebabkan oleh mekanisme kerja onkogen E6 dan E7 HPV agar virus dapat terus melakukan transkripsi DNA pada materi genetik di sel *host*. E6 menginhibisi atau mempromosikan degradasi dari *tumor suppressor gene* p53 yang mengakibatkan degradasi molekul-molekul jalur sinyal apoptosis sehingga memicu proliferasi sel dalam perkembangan tumor.[24]

Onkogen E7 mempunyai peran mempromosikan *cell dysplasia* pada serviks dengan mekanisme inaktivasi pRb sehingga menghentikan siklus sel, disregulasi siklus sel akan tetap bertahan di *S-phase* sehingga terjadi peningkatan laju pembentukan *spindle* yang menyebabkan pembentukan siklus sel yang tidak terkendali.[24]

Infeksi *Human Papilloma Virus* atau HPV juga menyebabkan inflamasi melalui aktivasi sel imun alamiah dan adaptif. Sel-sel imun alamiah seperti makrofag, sel Langerhans, *natural killer cells* menginhibisi aktivitas HPV dengan ekspresi *toll-like receptor* (TLRs). Aktivasi TLRs akan menaktivasi jalur antiviral lewat MHC kelas I dan II namun onkogen HPV E5 akan menginhibisi dan E6 akan menganggu sinyal dari TLRs. [6] HPV menhindari sistem imun alamiah *host* agar proses

replikasi dapat berjalan sehingga virus secara persisten menginfeksi sel host, kondisi ini disebut CIN 1 atau *cervical intraepithelial neoplasia* 1. Jika tidak membaik makan akan berkembang menjadi CIN 2/3 dalam 2-3 tahun, dalam 10-12 tahun lesi pre kanker akan bertransformasi menjadi karsinoma yang invasif[6].

HPV dapat menghindari sistem sel imun adaptif , setelah di fagositosis oleh sel dendritik maka akan dipresentasikan pada MHC kelas I dan II. Proses tersebut akan mengaktivasi sel T CD4+ yang mempunyai sifat sitoktoksik, meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IFN- γ dan TNF- α, namun proses mekanisme ini juga mengaktivasi sel Treg yang akan menghasilkan IL-10 dan TGF- β yang akan menginhibisi akitvitas APC menciptakan kondisi yang tepat untuk infeksi dan replikasi HPV.[6]

2.1.4 CaSki *cervical cancer cell line*

CaSki *cervical cancer cell line* merupakan sebuah lini sel dengan tipe karsinoma sel skuamosa yang diambil dari jaringan serviks uteri manusia yang mengandung 600 salinan HPV-16 yang terintegrasi dalam sel.[9] Lini sel CaSki merupakan lini yang positif mengandung *Human Papillomavirus* tipe 16, serta lini sel ini sering digunakan sebagai model penelitian untuk kanker serviks stadium lanjut.[25] CaSki *cervical cancer cell line juga* memiliki karakteristik fenotipik dan genotipik yang menyerupai kanker serviks invasif, sehingga sangat cocok untuk mempelajari mekanisme molekuler dan respons terhadap perlakuan, termasuk stress oksidatif. Jumlah Salinan atau *copy* DNA HPV-16 yang terkandung dalam lini sel CaSki yang mencapai 600 salinan[26] , bila dibanding dengan SiHa *cervical cancer cell line* yang hanya megandung 1-2 salinan DNA HPV-16 memberikan kemudahan dan reliabilitas dalam penelitian eksperimental yang akan dilakukan[27,28]. Kemudahan dalam kultur dan pemeliharaan CaSki *cell line* juga memungkinkan eksperimen dilakukan secara konsisten dan berulang. Oleh karena itu, pemilihan Ca Ski sebagai *cell line* penelitian memberikan dasar yang kuat untuk mendapatkan hasil yang valid dan aplikatif dalam konteks kanker serviks di Indonesia.

2.1.5 Peran SIRT1 dalam regulasi siklus sel dan apoptosis

Sirtuin (SIRTs) adalah keluarga enzim histon deasetilase (HDAC) yang bergantung pada nikotinamida adenin dinukleotida (NAD) dan memiliki peran dalam banyak fungsi seluler, termasuk deasetilasi histon, asilasi protein, dan deasetilasi. SIRT juga memiliki peran dalam sistem ARS atau *antioxidant and redox signaling pathways* sebagai respon terhadap stres oksidatif, sehingga dapat memperbaiki fungsi mitokondria & kerusakan DNA.[12]

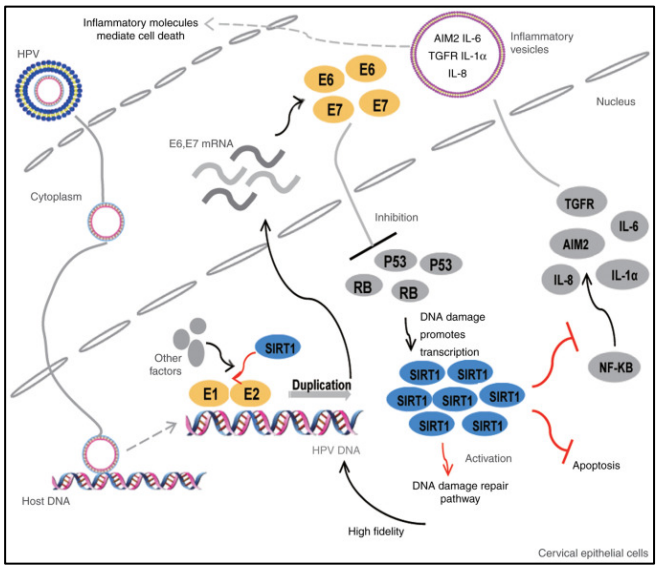
Dalam kondisi sel normal SIRT1 atau *Sirtuin 1* menurunkan kerusakan oleh stress oksidatif dan memperbaiki kerusakan DNA, regulasi apoptosis, dan memodulasi mekanisme pertahanan antioksidan. Namun dalam keadaan stress oksidatif berlebihan, terjadi redistribusi SIRT1 pada level kromatin yang mengakibatkan deregulasi transkripsi SIRT1, fungsi SIRT1 menurun sehingga terjadi peningkatan kerusakan seluler. [12]

2.1.6 Peran SIRT1 dengan jalur onkogenik HPV

SIRT1 juga mempunyai peran dalam perkembangan kanker serviks, Veles-Perez *et al.*[14] dan Singh S *et al.*[15] menuliskan bahwa terjadi overekspresi SIRT1 pada neoplasia intraepitel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa pada kanker serviks.[14,15] SIRT1 adalah komponen tambahan dalam onkogen E1-E2 dalam proses replikasi DNA HPV, dengan onkogen E6-E7 menginhibisi apoptosis dengan mendegradasi *tumor suppressor gene p53* dan protein retinoblastoma (pRb) sehingga infeksi persisten dan proliferasi sel tumor terjadi[16]. Infeksi HPV yang persisten akan menyebabkan kerusakan DNA *host* sehingga peningkatan ekspresi SIRT1 terjadi guna mengaktivasi proses perbaikan kerusakan DNA *host*.[16]

SIRT1 juga turun berperan dalam mensupresi transkripsi AIM2 dan *interleukin* yang diproduksi oleh NF-κB sebagai respon antiviral sel *host*, SIRT1 menurunkan inflamasi dan kematian sel, sehingga sel yang telah terinfeksi HPV dapat menghindari sistem imun alamiah tubuh dan replikasi DNA HPV tetap berjalan[16]. Proses infeksi yang persisten serta peran onkogen menyebabkan disregulasi fungsi seluler sel host yang menyebabkan proliferasi sel secara cepat

dan apoptosis sel yang menurun akan menghasilkan transisi dari sel sehat menjadi sel pre kanker.(6)



Gambar 1. Ilustrasi proses replikasi HPV dengan peran onkogen beserta peran SIRT1 pada onkogenesis kanker serviks

2.1.7 Ekspresi SIRT1 pada sel kanker serviks yang terinfeksi HPV

Berdasarkan penelitian Velez-Perez A *et al.*(14) dengan analisis ekspresi gen SIRT1 menggunakan metode *Immunohistochemistry essay* (IHC) pada spesimen seperti *Cervical Intraepithelial Neoplasia* atau CIN 1-3 dan SCC pada keganasan bidang ginekologi. Hasil menunjukan bahwa sampel dengan sel epitel gepeng yang tidak terpapar mempunyai hasil ekspresi gen SIRT1 yang negatif atau lemah. Pada sampel lesi tipe CIN dengan sel epitel gepeng yang mengalami *dysplasia* menunjukan hasil yang postif dan meningkat mengikuti ketinggian grade dari lesi *intraepithelial neoplasia*. Pada lesi CIN 2-3, aktivitas dari ekspresi SIRT1 menunjukan peningkatan yang signifikan dengan p=0.0001 bila dibandingkan dengan CIN 1.(13)

2.1.8 Mekanisme H_2O_2 pada tubuh manusia

Hidrogen peroksida atau H_2O_2 dalam konteks penelitian ini mengarah ke ranah stress oksidatif yang tergambar dalam *reactive oxygen species.* Pengunaan H_2O_2 sering digunakan pada penelitian untuk mewakilkan stress oksidatif,

dikarenakan H_2O_2 sering di manfaatkan sebagai model stress oksidatif karena menghasilkan radikal hidroksil (OH) melalui reaksi Fenton yaitu reaksi antara H_2O_2 dengan ion Fe^{2+}. Radikal hidroksil merupakan *reactive oxygen species* yang sangat reaktif dan mampu merusak komponen seluler penting seperti DNA, protein, dan membran lipid. Reaksi katalase juga terjadi dengan pemberian H_2O_2 juga meningkatkan konsentrasi O_2 intrasel dan menginduksi produksi oksigen radikal secara endogen sehingga memicu kerusakan sel.[11]

Berdasarkan Nunes *et al.*[29], pada kondisi sel non-kanker seperti plasenta H_2O_2 memiliki peran dalam kerusakan DNA. Stress oksidatif yang ditimbulkan oleh H_2O_2 pada kultur sel plasenta akan meningkatkan ekspresi protein TNF- α dan IL-1B, peningkatan ini akan mengaktivasi inflammasom, produksi sitokin pro-inflamasi, dan antioksidan yang di keluarkan oleh sistem imun alamiah.[29] Peningkatan ekspresi gen SIRT1 pada sel tumor kanker serviks mempunyai aktivitas supresi ekspresi AIM2 yang memiliki peran penting dalam proses kekebalan antivirus oleh NF-κB, menyebabkan penurun respon imun berupa kematian sel yang telah terinfeksi.[16] Penurunan respon tersebut dapat membantu perkembangan kanker serviks, maka pemberian H_2O_2 berperan sebagai variabel bebas dalam penelitian ini. Pemberian H_2O_2sebagai stres oksidatif guna meningkatkan mekanisme antivirus untuk menekan pertumbuhan sel kanker, dimana dapat dilihat kerja nya oleh melalui ekspresi gen SIRT1.

Zhang *et al.*[10] pada publikasi tahun 2015 menemukan bahwa pemberian H_2O_2pada SiHa *cervical cancer cell line* menghambat proliferasi *cell line* tersebut.[10] Pemberian H_2O_2 juga meningkatkan kadar ROS atau *reactive oxygen species* hingga 1.9 kali pada lini sel SiHa dengan $p<0.01$. [10] ROS memiliki peran dalam *carcinogenesis* dan progresi *tumorgenesis*, namun juga memiliki peran apoptosis pada sel neoplastik di semua tahap *tumorigenesis*. Peningkatan ROS tanpa kompensasi redoks yang adekuat dapat menyebabkan apoptosis sel.[30] Produksi ROS yang melebihi kapasitas antioksidan suatu sel membuat kondisi stress oksidatif pada sel tersebut, stress oksidatif akan memodulasi aktivitas NF-κB lewat sitokin pro-inflamasi. Namun NF-κB juga memiliki peran supresi, sehingga reaksi yang dihasilkan dapat berupa peran antioksidan dan pro-oksidan.[31]

Sirtuin 1 dan H_2O_2 kerap dibahas bersama, publikasi penelitian oleh Yao *et al*.[32] pada tahun 2017 menunjukan bahwa overekspresi SIRT 1 terbukti dapat menurunkan kadar *reactive oxygen species* dan apoptosis dibanding kelompok kontrol tanpa pemberian SIRT1, menunjukan terdapat sebuah hubungan antara SIRT1 dan stress oksidatif yang diwakilkan dengan menggunakan H_2O_2.[32] Penelitian ini menggunakan stres oksidatif yang di gambarkan oleh H_2O_2 untuk melihat apakah dengan pemberian dosis yang berlebihan dapat menginduksi deregulasi transkripsi gen *Sirtuin 1* pada kondisi sel kanker serviks.

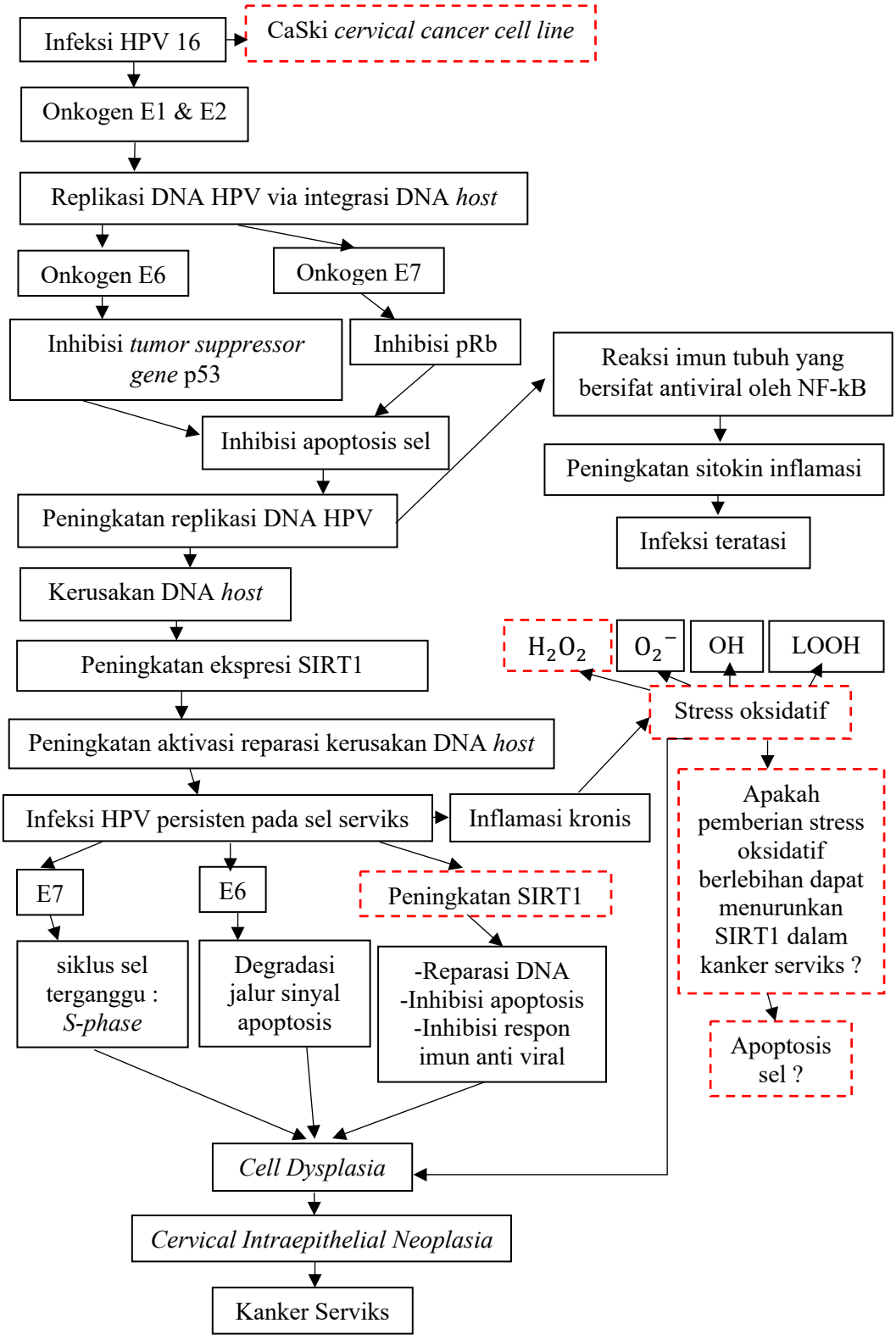
2.2 Ringkasan pustaka

Tabel 1. Ringkasan pustaka

Peneliti	Lokasi & waktu	Desain	Subjek	Variabel yang diteliti	Lama	Hasil
Singh *et al*. [15]	India	Studi Analitik Observasional	Jaringan Serviks dari wanita usia 25-70 tahun	Ekspresi gen SIRT1, SIRT2, dan SIRT7	2015	Hasil IHC menunjukan peningkatan dari ekspresi gen SIRT1 pada 41% sitoplasma lesi pre-neoplastik (p= 0.032) namun menunjukan peningkatan yang signifikan 59% pada nukleus di sampel lesi pre-neoplastik (p= 0.001) dari basal, parabasal, intermediate, dan lapisan superfisial bila dibandingkan dengan sampel non neoplastik.
Velez-Perez *et al.*[13]	Amerika Serikat	Studi Komparasi	Bahan tersimpan dari specimen jaringan serviks uteri	Ekspresi gen SIRT1	2017	Hasil IHC menunjukan peningkatan pada sampel SCC baik di sitoplasma (ekspresi 34% dengan p=0.067) dan nucleus (ekspresi 30% dengan p=0.052) Ekspresi gen SIRT1 pada lesi pre neoplastic menunjukan hasil yang signifikan CIN 1 13.8%, CIN 2 40,6% , CIN 3 50% dengan (p=0.01) p value menggambarkan perbedaan antara CIN 1 dan CIN 2-3. Ekspresi gen SIRT1 pada SCC dam SCC *microinvasive* menunjukan 70.8% dengan (p=0.0001) , *p value* menggambarkan perbedaan antara SCC dan CIN 2-3.

Zhang P *et al.*[10]	Republik Rakyat Tiongkok	Studi Eksprerimental	Lini sel kanker serviks HeLa & SiHa. Lini sel epitel serviks GH329 & SW756	Pemberian H_2O_2, proliferasi sel, GSH, GSSG, SOD, CAT, GPx	2015	Dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi perlakuan, H_2O_2 secara signifikan menghambat pertumbuhan sel Siha, SW756, HeLa, dan GH329 ($p < 0,05$). Kadar ROS pada sel Siha dan SW756 meningkat secara signifikan, masing-masing hingga 1,9 dan 2,3 kali lipat dibandingkan kelompok kontrolnya ($p < 0,01$). Kadar ROS pada keempat jenis sel ini meningkat secara signifikan setelah perlakuan H_2O_2 dibandingkan dengan sel yang tidak diberi perlakuan ($p < 0,05$ atau 0,01). Aktivitas SOD meningkat secara signifikan setelah perlakuan H_2O_2 ($p < 0,05$ atau 0,01) Peningkatan aktivitas CAT pada keempat jenis sel ini ($p < 0,01$). Meningkatkan aktivitas GPx pada semua sel ($p < 0,05$ atau 0,01).

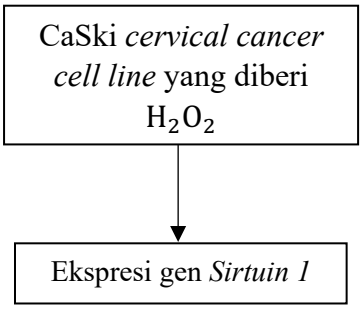
2.3 Kerangka teori



Gambar 2. Kerangka teori

BAB III
KERANGKA KONSEP DAN DEFINISI OPERASIONAL

3.1 Kerangka konsep



Gambar 3. Kerangka konsep

3.2 Variabel penlitian

3.2.1 Variabel tergantung

Penelitian ini menggunakan ekspresi gen *Sirtuin* 1 sebagai variabel tergantung.

3.2.2 Variabel bebas

Penelitian ini menggunakan stres oksidatif yang di wujudkan dalam pemberian dosis H_2O_2 sebagai variabel bebas.

3.3 Definisi operasional

Tabel 2. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Alat ukur	Cara mengukur	Hasil	Skala	Referensi
1. Ekspresi gen SIRT1	Enzim deasetilase yang bergantung pada NAD+ dan memiliki peran onkogenik.	qRT-PCR	Teknik berbasis PCR yang digunakan untuk mengkuantifikasi jumlah DNA atau RNA target dalam suatu sampel tertentu.	Angka jumlah ekspresi relatif gen SIRT1 yang terbentuk	Numerik	Gupta, *et al.* [33]
H_2O_2(Hidrogen peroksida) 250 µM	H_2O_2 berasal perubahan anion superoksida O^{2-} atau oksigen bebas dalam intrasel oleh superoksida dismutase	*Micropipette*	Metode titrasi untuk pengeceran H_2O_2 dengan H_2O yang telah disuling selama 2 kali	Angka konsentrasi H_2O_2 dengan satuan µM	Numerik	Zhang *et al.* [10]
H_2O_2(Hidrogen peroksida) 1000 µM	H_2O_2 berasal perubahan anion superoksida O^{2-} atau oksigen bebas dalam intrasel oleh superoksida dismutase	*Micropipette*	Metode titrasi untuk pengeceran H_2O_2 dengan H_2O yang telah disuling selama 2 kali	Angka konsentrasi H_2O_2 dengan satuan µM	Numerik	Zhang *et al.* [10]

BAB IV
METODE

4.1 Desain penelitian

Desain penelitian yang akan digunakan pada penelitian ini merupakan jenis studi eksperimental *in vitro* dengan menggunakan CaSki *cervical cell line*. Penelitian ini akan menganalisa perbedaan kadar ekspresi gen SIRT1 pada sampel control dengan yang mendapatkan pemberian H_2O_2 yang menyerupai kondisi stress oksidatif di lingkungan sel.

4.2 Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biomolekular Kampus B Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti, Jalan Kyai Tapa No. 260, RT.5/RW.9, Tomang, Kecamatan Grogol, Jakarta Barat, Indonesia. Lama waktu penelitian ini akan dilakukan selama 5 bulan mulai dari bulan Agustus hingga Desember 2025.

4.3 Sampel

Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah CaSki *cervical cancer cell line*. CaSki *cell line* ini akan di kultur serta diberi intervensi. Penggunaan sampel dengan *cell line* memastikan bahwa penelitian ini dilakukan pada sel kanker tipe karsinoma sel skuamosa dengan infeksi virus HPV-16. Sampel yang digunakan berjumlah 3 piring pada setiap kelompok perlakuan , dengan total 9 piring. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* di lab dengan kondisi yang terkontrol, serta menggunakan *cell line* tipe *non-primary cell* dimana *cell line* yang digunakan diproduksi secara komersil. Pemilihan tipe sampel pada penelitian ini mempunyai variabilitas yang rendah, sehingga *effect size* nya besar sehinggan jumlah sampel untuk mencapai 80% / 0.8 power tidak perlu banyak.[34] Untuk menentukan proporsi sel yang akan di berikan intervensi dalam 1 piring batas *cell confluency* setinggi 80%.

4.3.1 Kriteria pemilihan sampel

1. Kriteria inklusi:
   - CaSki *cervical cancer cell line* yang terautentikasi sertifikat STR
   - CaSki *cervical cancer cell line* memiliki persentase sel hidup ≥ 80% (power statistics) , viabilitas akan diuji melalui metode MTT *assay*.
2. Kriteria eksklusi:
   - CaSki *cervical cancer cell line* yang terkontaminasi mikroba, umumnya kontaminasi mikoplasma , akan di ukur dengan kultur mikoplasma *agar plate* dan *broth culture*. [35]
   - CaSki *cervical cancer cell line* yang mengalami perubahan secara morfologi.

4.4 Bahan dan instrumen penelitian

4.4.1 Bahan

- Preparasi sampel/ jaringan:
  1. Sampel dari CaSki *cervical cancer cell* yang telah di beri perlakuan
  2. DNA/RNA *shield*
  3. RNA *lysis buffer*
- Kit *Total* RNA *purification*:
  1. Etanol 95-100%
  2. RNA *wash buffer*
  3. *DNase I*
  4. DNA *digestion buffer*
  5. RNA *prep buffer*
  6. RNA *wash buffer*
  7. *DNase/RNase-Free water*
- Kit sintesis cDNA SensiFAST:
  1. Sampel RNA
  2. *Master mix*

Tabel 3. Komponen *master mix*

Komponen	Volume
Total RNA atau mRNA (maksimal 1 µg)	*n* µL
Reverse Transcriptase	4 µL
Buffer TransAmp 5x	4 µL
DNase/RNase free-water	Tambahkan hingga total 20 µL

- Kit *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR):
  1. Sampel cDNA
  2. SensiFAST SYBR Green No.-ROX *marker*
  3. *Forward* dan *Reverse* Primer
  4. *Nuclease Free Water*

Tabel 4. Sekuens primer untuk gen SIRT1 dan GADPH yang akan digunakan pada penelitian[36]

Primer	Sekuens
Sirtuin 1 Forward	CTATACCCAGAACATAGACACG
Sirtuin 1 Reverse	ACAAATCAGGCAAGATGC
GADPH Forward	GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G
GADPH Reverse	ACC ACC CTG TTG CTG No. CCA A

4.4.2 Instrumen penelitian

- **Preparasi Sampel/Jaringan:**

  1. Tabung sentrifugasi dengan ukuran 2 ml untuk menampung sampel

  2. *Collection tube* berfungsi menampung supernatan yang merupakan hasil dari sentrifugasi

  3. *Nuclease-free tube* berfungsi menampung hasil supernatan untuk proses RNA *purification*

- **Total RNA *purification*:**

  1. Tabung sentrifugasi dengan ukuran 2 ml untuk menampung sampel

  2. *Collection tube* berfungsi menampung supernatan yang merupakan hasil dari sentrifugasi

  3. *Spin-away filter* berwarna kuning untuk menyaring hasil sentrifugasi, dimana *flow-through* akan digunakan untuk isolasi.

4. *Spin column* berwarna hijau sebagai tabung untuk menampung hasil sampel RNA

5. *Microtips* pada ujung pipet untuk mencegah kontaminasi antar sampel saat pemindahan sampel

6. *Micropipette* sebagai alat untuk mengambil sampel dengan takaran volume yang akurat dan presisi yang tinggi.

7. Mesin *Microcentrifuge* merupakan mesin yang digunakan untuk memutarkan sampel dengan kecepatan tinggi untuk memisahkan RNA dari serum

8. Mesin *Dry bath incubator* digunakan untuk menginkubasi sampel dalam waktu dan suhu tertentu

- **Prosedur sintesis *copy* DNA:**

  1. Mesin PCR (SENSOQUEST) untuk amplifikasi

  2. PCR *tube* untuk menampung sampel

  3. *Micropipette* sebagai alat untuk mengambil sampel dengan takaran volume yang akurat dan presisi yang tinggi.

  4. *Microtips* pada ujung pipet untuk mencegah kontaminasi antar sampel saat pemindahan sampel

- **Proses *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (qRT PCR) :**

  1. Mesin qPCR (Rotor Gene 3000 Qiagen) digunakan untuk proses amplifikasi sampel cDNA

  2. PCR *tube* untuk menampung sampel yang akan diuji

  3. *Micropipette* sebagai alat untuk mengambil sampel dengan takaran volume yang akurat dan presisi yang tinggi.

  4. *Microtips* pada ujung pipet untuk mencegah kontaminasi antar sampel saat pemindahan sampel

4.5 Metode

4.5.1 Kultur CaSki *cervical cancer cell line*

CaSki *cervical cancer line* (tipe karsinoma sel skuamosa) dibeli dari *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). CaSki *cell line*

pada penelitian ini akan melewati proses kultur pada media kultur DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) dengan suplementasi 5% FCS (*fetal calf serum*), diberikan 1% penisilin & streptomisin sulfat, serta 1% fungizone (*amphotericin B*). Sel akan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 38,5 °C dan 5% CO2 hingga pertemuan 60-70%. Setelah 24 jam kultur akan di cuci oleh 1X PBS (*phosphate buffered saline*) , sel akan di tes untuk mengetahui berapa jumlah sel yang dihasilkan untuk menentukan RNA lysis yang akan digunakan dan jumlah pembagian sel untuk 9 piring kultur. Proses kultur akan diulang hingga jumlah sel mencapai jumlah tertentu.

Pada penelitian ini 9 piring kultur tersebut akan dibagi menjadi 3 kelompok yaitu : 1 kelompok akan mempunyai 3 buah piring kultur untuk pemberian H_2O_2 dengan konsentrasi 250 µM, 1 kelompok dengan pemberian H_2O_2 dengan konsentrasi 1000 µM, serta 1 kelompok yang tidak diberikan intervensi sebagai kontrol. Kultur dengan intervensi akan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38,5 °C dan 5% CO2 dengan pemberian 1% penisilin & streptomisin sulfat, serta 1% fungizone (*amphotericin B*). Setelah melewati proses inkubasi sel akan di *harvest* dengan *scraping* dan di tempatkan pada tabung koleksi untuk preparasi sampel.

4.5.2 Pembuatan H_2O_2 konsentrasi 250 µM dan 1000 µM

1. H_2O_2 di beli dengan konsentrasi 30% akan di dilusi dengan H_2O yang telah disuling sebanyak 2 kali.
2. Formula dilusi yang digunakan adalah sebagai berikut :

$$M1xV1 = M2xV2$$

Penggunaan konsentrasi 250 µM dan 1000 µM sebagai konsentrasi yang dipilih berdasarkan hasil penelitian oleh Zhang P *et al*[10] pada 2015, hasil penelitian menunjukan 250 µM belum menunjukan hasil yang signifikan dan 1000 µM menunjukan hasil yang signifikan. Penelitian ini tidak memilih 500 µM meskipun penelitian sebelumnya menunjukan hasil signifikan, dikarenakan ingin melihat hasil yang lebih drastis.

3. Untuk 250 µM perhitungan sebagai berikut :
    - Diketahui:
        - M_1 = 30% H_2O_2 ≈ 9,8 M
        - M_2 = 250 µM = 0,00025 M
        - V_2 = 10 mL
    - Hitung V_1:
        $V_1 = (M_2 \times V_2) / M_1$
        $V_1 = (0{,}00025 \times 10) / 9{,}8 = 0{,}00255 / 9{,}8 \approx 0.00026$ mL = 0,255 µL

    campurkan 0,255 µL H_2O_2 30% dengan 10 mL H_2O yang telah disuling sebanyak 2 kali.
4. Untuk 1000 µM perhitungan sebagai berikut :
    - Diketahui**:**
        - M_1 = 30% H_2O_2 ≈ 9,8 M
        - M_2 = 1000 µM = 0,001 M
        - V_2 = 10 mL
    - Hitung V_1:
        $V_1 = (M_2 \times V_2) / M_1$
        $V_1 = (0{,}001 \times 10) / 9{,}8 = 0{,}01 / 9{,}8 \approx 0.00102$ mL = 1,02 µL

    campurkan 1,02 µL H_2O_2 30% dengan 10 mL H_2O yang telah disuling sebanyak 2 kali.

4.5.3 Preparasi sampel/jaringan

1. Hasil dari *harvest* jaringan akan di tempatkan pada tabung koleksi dengan jumlah larutan RNA *Lysis Buffer* (1:1) sebanding dengan jumlah sel yang di kumpulkan.
2. Campurkan kedua larutan tersebut menggunakan *micropipette*.
3. Lanjutkan ke tahap purifikasi RNA.

4.5.4 Total RNA *purification*

1. Transfer sampel yang telah di lisiskan oleh RNA lysis buffer ke dalam *Spin-away Filter* yang bewarna kuning yang telah dipasangkan kedalam tabung koleksi, lalu sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik

untuk memisahkan sebagian besar DNA genom. Simpan cairan *flow-through.*

2. Tambahkan etanol 95-100% kedalam tabung berisi cairan *flow-through* dengan perbandingan volume 1:1 , lalu campurkan. Transfer campuran tersebut kedalam *Spin Column* bewarna hijau yang telah dipasangkan kedalam tabung koleksi, sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik. Ganti dengan tabung koleksi yang baru.
3. Cuci *column* dengan 400 µl RNA *Wash Buffer* sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik. Ganti dengan tabung koleksi yang baru.
4. Tambahkan 5 µl DNase I (1 U/µl) dan 75 µl DNA *Digestion Buffer* pada *nuclease-free tube* , campurkan dan pindahkan larutan ke dalam *column matrix*.
5. Inkubasi *column* selama 15 menit pada suhu ruangan (20-30°C).
6. Tambahkan 400 µl RNA *Prep Buffer* pada *column* lalu sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik. Ganti dengan tabung koleksi yang baru.
7. Tambahkan 700 µl RNA *Wash Buffer* pada *column* lalu sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik. Ganti dengan tabung koleksi yang baru.
8. Tambahkan 400 µl RNA *Wash Buffer* pada *column* lalu sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 1 menit untuk menghilangkan *buffer* secara menyeluruh. Buang tabung koleksi, transfer *column* ke *nuclease-free tube.*
9. Tambahkan 100 µl DNase/RNase-*Free Water* pada *column* lalu sentrifugasi pada kecepatan 10,000-16,000 x g selama 30 detik. Hasil isolasi RNA berada pada dasar tabung koleksi.

4.5.5 Prosedur sintesis cDNA

1. Persiapkan *master mix* di atas es
2. Vortex semua larutan dan sentrifugasi sebentar terlebih dahulu
3. Masukan master mix dan sampel RNA kedalam PCR *tube* , campur perlahan menggunakan pipet

4. Ubah pengaturan program berikut pada mesin *thermal cycler* :
    a. 25 °C selama 10 menit (penempelan primer / *annealing*)
    b. 42 °C selama 15 menit (transkripsi balik/ *reverse transcription*)
    c. 85 °C selama 5 menit (inaktivasi enzim)
    d. Tahan pada 4 °C (atau cara alternatif dengan mendinginkan di atas es)
5. Penyimpanan sampel cDNA pada suhu -20 °C untuk analisis lebih lanjut.

4.5.6 Prosedur 2-*step Quantitative real-time* PCR

1. Masukan 4 µl sampel cDNA, SensiFAST SYBR Green No.-ROX *marker* , *Forward* Primer, *Reverse* Primer , dan *Nuclease Free Water* dengan jumlah total tambahan ke 3 bahan tersebut mencapai 16 µl ke dalam tabung PCR.
2. Masukan kedalam mesin qPCR selama 50 siklus
3. Proses *annealing* dilakukan pada suhu 56,5°C

4.6 Analisis data

Analisis hasil *quantitative real-time* PCR dalam penelitian ini akan dimasukan menggunakan rumus sebagai berikut :

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

- *Average* ΔCt = rata-rata dari hasil pengurangan *cycle threshold* gen *GAPDH* dengan ekspresi SIRT1
- Rumus tersebut digunakan untuk membandingkan ekspresi gen SIRT1 dengan ekspresi gen GAPDH *(housekeeping gene)* yang diekspresikan secara konsisten pada semua sel tubuh. Data numerik yang menggambarkan ekspresi SIRT1 akan menjadi hasil akhir yang akan di ujikan secara statistik.

4.6.1 Analisis univariat

Metode analisis univariat akan digunakan untuk mendeskripsikan hasil data variabel tergantung yaitu ekspresi gen SIRT1 baik sebelum dan sesudah pemberian H_2O_2, dimana hasil berupa frekuensi dan persentase ekspresi gen. Data varibel tergantung akan melewati uji normalitas *Shapiro-Wilk test*, dikarenakan jumlah sampel <50 buah. Apabila hasil data berdistribusi normal, maka hasil akan disajikan dengan bentuk mean ± SD. Jika hasil data tidak berdistribusi normal, maka hasil

akan disajikan dengan bentuk median ± CI, dimana nilai p<0,05 menunjukan hasil bermakna.

4.6.2 Analisis bivariat

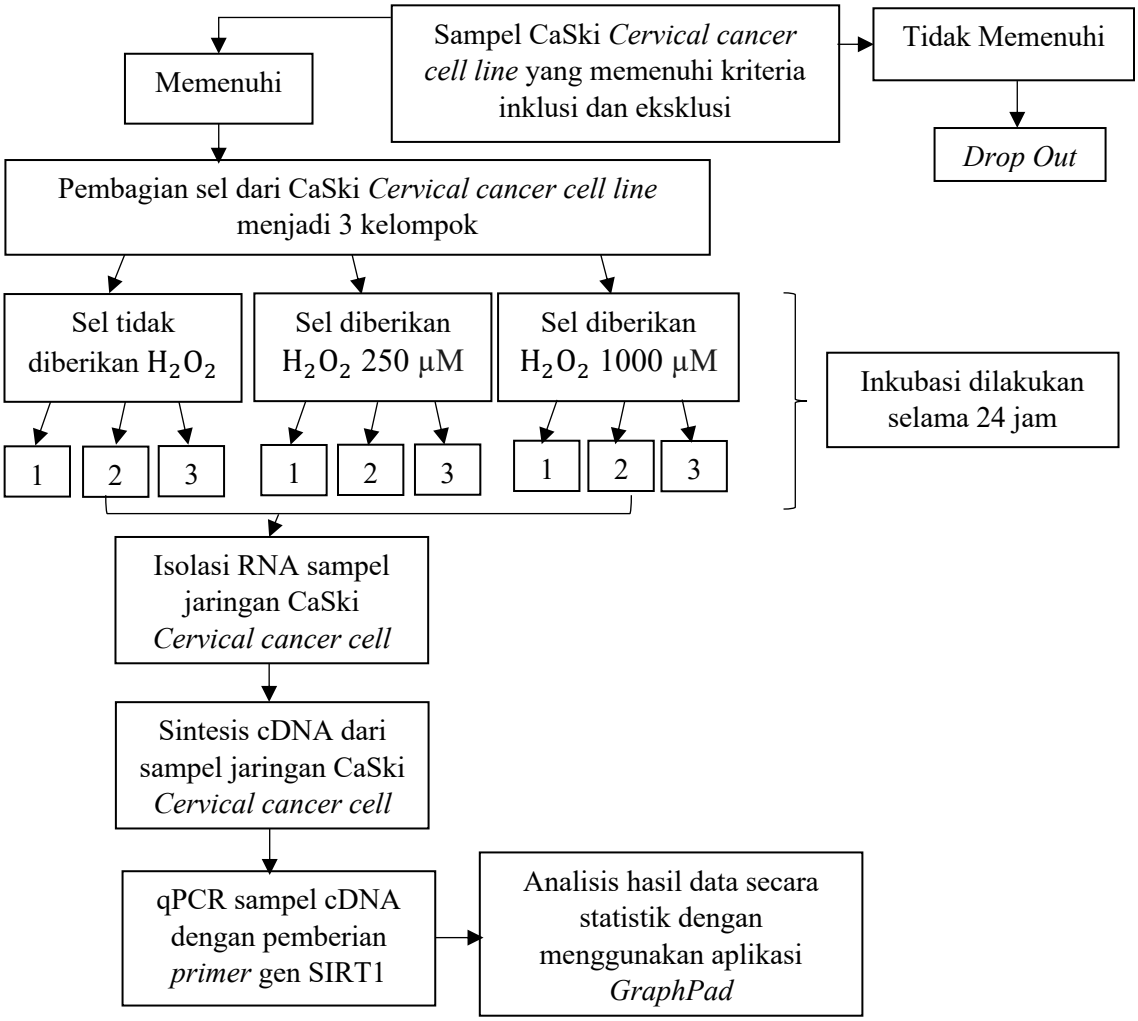
Metode analisis bivariat yang akan digunakan untuk mencari hubungan antara hasil data sebelum dan sesudah pemberian H_2O_2 dengan 2 dosis yang berbeda adalah dengan metode *One-way* ANOVA apabila data berdistribusi normal dan *Kruskal-Wallis test* apabila data tidak berdistribusi normal. Hasil pengujian data akan disajikan dalam *p-value* atau nilai signifikan (dimana nilai p <0,05 menunjukan hasil signifikan atau bermakna). Signifikansi hubungan akan diuji dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji *post-hoc Dunnett's test* akan dilakukan untuk membandingkan hasil dengan kontrol yang tidak diberi H_2O_2.

Tabel 5. *Dummy table* perbedaan ekspresi gen *SIRT1* pada 3 kelompok dengan pemberian H_2O_2

Jumlah Ekspresi Gen *SIRT1*	Kontrol / Tidak diberi H_2O_2	H_2O_2 dosis 250 μM	H_2O_2 dosis 1000 μM	*p-value*
Mean ± SD / Median ± CI				

Analisis data menggunakan uji *One-way* ANOVA untuk hasil terdistribusi normal dan *Kruskal-Wallis test* untuk data tidak terdistribusi normal. Batas kemaknaan statistik yang digunakan p<0,05.

4.7 Alur kerja penelitian



Gambar 4. Alur kerja

4.8 Etika penelitian

Penelitian ini akan dilakukan setelah proposal penelitian dengan judul "Perubahan Ekspresi Gen Sirtuin 1 Pada Sel CaSki yang diberikan H_2O_2" disetujui oleh tim penguji skripsi. Peneliti lalu akan mengisi formulir permohonan kaji etik riset, penelitian akan dilaksanakan setelah lolos kaji etik Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti.

4.9 Penjadwalan penelitian

Tabel 6. Penjadwalan pelaksanaan penelitian

Kegiatan	WAKTU										
	Feb 2025	Mar 2025	Apr 2025	Mei 2025	Jun 2025	Jul 2025	Aug 2025	Sep 2025	Okt 2025	Nov 2025	Dec 2025
Perumusan topik & pemilihan judul											
Persiapan dan pencarian sampel yang tersedia											
Penyusunan dan penyelesaian BAB I											
Penyusunan dan penyelesaian BAB II											
Penyusunan dan penyelesaian BAB III											
Penyusunan dan penyelesaian BAB IV											
Konsultasi											
Penyerahan proposal											
Persiapan ujian											
Ujian proposal											
Pengerjaan sampel											

Analisis data											
Penyusunan skripsi											
Penyusunan manuskrip publikasi E-jurnal											

4.10 Biaya penelitian

Tabel 7. Rincian perkiraan pengeluaran penelitian

No.	Keterangan	Jumlah	Pembiayaan
1.	Kit Isolasi RNA (9 sampel)	1	Rp 1.000.000
2.	*cDNA synthesis kit* (9 sampel)	1	Rp 1.500.000
3.	*SYBR Green PCR kit*	200 rx	Rp 1. 000.000
4.	Biaya sewa laboratorium molekuler	6 bulan	Rp 500.000
Total Pengeluaran			Rp 4.000.000
Dana Hibah Penelitian			Rp 2.000.000
Total Pengeluaran yang ditanggung mahasiswa			Rp 2.000.000

DAFTAR PUSTAKA

1. Cervical cancer [Internet]. DOI: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer
2. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Ibrahim Khalil A, Baussano I, Shah AS V, et al. Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. Lancet Glob Health. 2021 Feb;9(2):e161–9.
3. Fowler JR, Maani E V., Dunton CJ, Gasalberti DP, Jack BW. Cervical Cancer. 2025.
4. Pešut E, Đukić A, Lulić L, Skelin J, Šimić I, Gašperov NM, et al. Human papillomaviruses-associated cancers: An update of current knowledge. Viruses. 2021 Nov 1;13(11):2234. DOI: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8623401/
5. Zhang S, Xu H, Zhang L, Qiao Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. Chinese Journal of Cancer Research. 2020;32(6):720. DOI: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7797226/
6. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. Medicina (B Aires). 2019;55(7):384. DOI: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6681523/
7. Annunziata C, Pezzuto F, Greggi S, Ionna F, Losito S, Botti G, et al. Distinct profiles of *TERT* promoter mutations and telomerase expression in head and neck cancer and cervical carcinoma. Int J Cancer. 2018 Sep 17;143(5):1153–61. DOI: 10.1002/ijc.31412
8. Lee JE, Chung Y, Rhee S, Kim TH. Untold story of human cervical cancers: HPV-negative cervical cancer. BMB Rep. 2022 Sep 30;55(9):429–38. DOI: 10.5483/BMBRep.2022.55.9.042
9. Smits HL, Cornelissen MTE, Jebbink MF, ban Den Tweel JG, Struyk APHB, Briët M, et al. Human papillomavirus type 16 transcripts expressed from viral-cellular junctions and full-length viral copies in CaSki cells and in a cervical carcinoma. Virology. 1991 Jun;182(2):870–3. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90632-L
10. Zhang P, Yin H, Wang S, Wei Y, Peng N, Bi W, et al. Different effects of H 2 O 2 treatment on cervical squamous carcinoma cells and adenocarcinoma cells. Archives of Medical Science. 2015;6:1308–13. DOI: 10.5114/aoms.2015.56356
11. Ransy C, Vaz C, Lombès A, Bouillaud F. Use of H2O2 to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. Int J Mol Sci. 2020 Nov 30;21(23). DOI: 10.3390/ijms21239149

12. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. Antioxid Redox Signal. 2018 Mar 10;28(8):643–61. DOI: 10.1089/ars.2017.7290

13. Velez-Perez A, Wang XI, Li M, Zhang S. SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. Hum Pathol. 2017 Jan;59:102–7.

14. Velez-Perez A, Wang XI, Li M, Zhang S. SIRT1 overexpression in cervical squamous intraepithelial lesions and invasive squamous cell carcinoma. Hum Pathol. 2017 Jan 1;59:102–7. DOI: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720890/

15. Singh S, Kumar PU, Thakur S, Kiran S, Sen B, Sharma S, et al. Expression/localization patterns of sirtuins (SIRT1, SIRT2, and SIRT7) during progression of cervical cancer and effects of sirtuin inhibitors on growth of cervical cancer cells. Tumour Biol. 2015 Aug 24;36(8):6159–71. DOI: 10.1007/S13277-015-3300-Y

16. Chen J, Chen H, Pan L. SIRT1 and gynecological malignancies. Oncol Rep. 2021 Apr 1;45(4):43. DOI: 10.3892/OR.2021.7994

17. Chen H, Zhang W, Cheng X, Guo L, Xie S, Ma Y, et al. β2-AR activation induces chemoresistance by modulating p53 acetylation through upregulating Sirt1 in cervical cancer cells. Cancer Sci. 2017 Jul 1;108(7):1310. DOI: 10.1111/CAS.13275

18. Xia X, Zhou X. Knockdown of SIRT1 inhibits proliferation and promotes apoptosis of paclitaxel-resistant human cervical cancer cells. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2018 May 15;64(6):36–41. DOI: http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.6.7

19. Zaher A, Petronek MS, Allen BG, Mapuskar KA. Balanced Duality: H2O2-Based Therapy in Cancer and Its Protective Effects on Non-Malignant Tissues. Int J Mol Sci. 2024 Aug 15;25(16). DOI: 10.3390/ijms25168885

20. Statistics at a glance, 2022 Top 5 most frequent cancers Number of new cases.

21. Statistics at a glance, 2022 Top 5 most frequent cancers Number of new cases 408 661 Number of deaths 242 988 Number of prevalent cases (5-year).

22. Vet JNI, De Boer MA, Van Den Akker BEWM, Siregar B, Lisnawati, Budiningsih S, et al. Prevalence of human papillomavirus in Indonesia: a population-based study in three regions. Br J Cancer. 2008 Jul 8;99(1):214. DOI: 10.1038/SJ.BJC.6604417

23. Zhang L, Li M, Yuan F, Jiang J, Zhang X. The difference of transcriptome of HPV-infected patients contributes more to the occurrence of cervical cancer than the mutations of E6 and E7 genes in HPV16. Medicine. 2024 Jan 19;103(3):e36822. DOI: 10.1097/MD.0000000000036822

24. Bhattacharjee R, Das SS, Biswal SS, Nath A, Das D, Basu A, et al. Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. Crit Rev Oncol Hematol. 2022 Jun;174:103675. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2022.103675

25. Choo CK, Rorke EA, Eckert RL. Differentiation-independent Constitutive Expression of the Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Oncogenes in the CaSki Cervical Tumour Cell Line. Journal of General Virology. 1994 May 1;75(5):1139–47. DOI: 10.1099/0022-1317-75-5-1139

26. Ca Ski - CRL-1550 | ATCC [Internet]. DOI: https://www.atcc.org/products/crl-1550

27. Friedl F, Kimura I, Osato T, Ito Y. Studies on a New Human Cell Line (SiHa) Derived from Carcinoma of Uterus. I. Its Establishment and Morphology. Exp Biol Med. 1970 Nov 1;135(2):543–5. DOI: 10.3181/00379727-135-35091a

28. SiHa - HTB-35 | ATCC [Internet]. DOI: https://www.atcc.org/products/htb-35

29. Nunes PR, Peracoli MTS, Romao-Veiga M, Matias ML, Ribeiro VR, Da Costa Fernandes CJ, et al. Hydrogen peroxide-mediated oxidative stress induces inflammasome activation in term human placental explants. Pregnancy Hypertens. 2018 Oct;14:29–36. DOI: 10.1016/j.preghy.2018.07.006

30. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. Cancer Cell. 2020 Aug;38(2):167–97. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.06.001

31. Lingappan K. NF-κB in oxidative stress. Curr Opin Toxicol. 2018 Feb;7:81–6. DOI: 10.1016/j.cotox.2017.11.002

32. Yao H, Yao Z, Zhang S, Zhang W, Zhou W. Upregulation of SIRT1 inhibits H2O2-induced osteoblast apoptosis via FoxO1/β-catenin pathway. Mol Med Rep. 2018 Mar 1; DOI: 10.3892/mmr.2018.8657

33. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. J Cytol. 2019;36(2):116–7. DOI: 10.4103/JOC.JOC_110_18

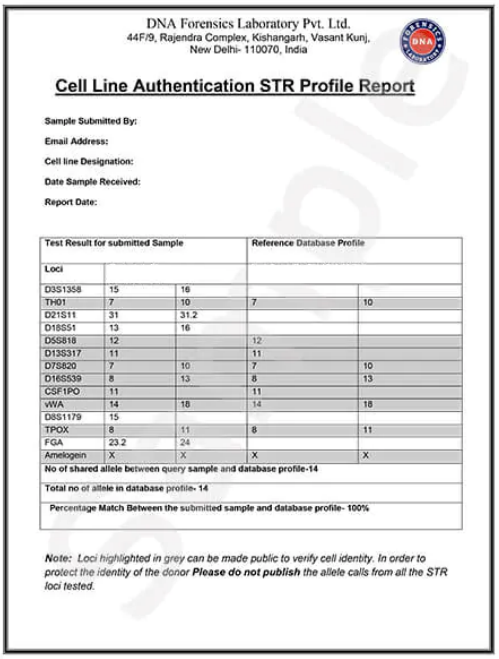
34. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. Biochem Med (Zagreb). 2021 Feb 15;31(1):27–53. DOI: 10.11613/BM.2021.010502

35. Mycoplasma Contamination | ATCC [Internet]. DOI: https://www.atcc.org/the-science/authentication/mycoplasma-contamination

36. Yohana Y, Faradilla MA, Tungka EX, Kurniasari K. Gene expression of sirtuin-1 in adult with hypertension. JPBIO (Jurnal Pendidikan Biologi). 2025 Apr 30;10(1):50–8. DOI: 10.31932/jpbio.v10i1.4456

LAMPIRAN

Lampiran 1. Contoh sertifikat STR (Short Tandem Repeat) profiling



DNA Forensics Laboratory Pvt. Ltd.
44F/9, Rajendra Complex, Kishangarh, Vasant Kunj,
New Delhi- 110070, India

Cell Line Authentication STR Profile Report

Sample Submitted By:

Email Address:

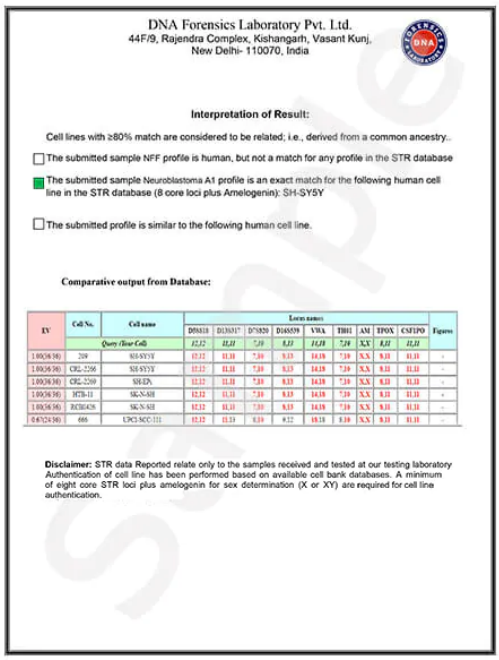
Cell line Designation:

Date Sample Received:

Report Date:

Test Result for submitted Sample			**Reference Database Profile**	
Loci				
D3S1358	15	16		
TH01	7	10	7	10
D21S11	31	31.2		
D18S51	13	16		
D5S818	12		12	
D13S317	11		11	
D7S820	7	10	7	10
D16S539	8	13	8	13
CSF1PO	11		11	
vWA	14	18	14	18
D8S1179	15			
TPOX	8	11	8	11
FGA	23.2	24		
Amelogein	X	X	X	X
No of shared allele between query sample and database profile-14				
Total no of allele in database profile- 14				
Percentage Match Between the submitted sample and database profile- 100%				

Note: Loci highlighted in grey can be made public to verify cell identity. In order to protect the identity of the donor ***Please do not publish*** *the allele calls from all the STR loci tested.*



DNA Forensics Laboratory Pvt. Ltd.
44F/9, Rajendra Complex, Kishangarh, Vasant Kunj,
New Delhi- 110070, India

Interpretation of Result:

Cell lines with ≥80% match are considered to be related; i.e., derived from a common ancestry..

☐ The submitted sample NFF profile is human, but not a match for any profile in the STR database

☑ The submitted sample Neuroblastoma A1 profile is an exact match for the following human cell line in the STR database (8 core loci plus Amelogenin): SH-SY5Y

☐ The submitted profile is similar to the following human cell line.

Comparative output from Database:

ID	Cell No.	Cell name	Locus names								Figures
			D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO	
		Query /Your Cell	*12,12*	*11,11*	*7,10*	*8,13*	*14,18*	*7,10*	*X,X*	*8,11*	*11,11*	
1.00(36/36)	209	SH-SY5Y	12,12	11,11	7,10	8,13	14,18	7,10	X,X	8,11	11,11	-
1.00(36/36)	CRL-2266	SH-SY5Y	12,12	11,11	7,10	8,13	14,18	7,10	X,X	8,11	11,11	-
1.00(36/36)	CRL-2269	SH-EP1	12,12	11,11	7,10	8,13	14,18	7,10	X,X	8,11	11,11	-
1.00(36/36)	HTB-11	SK-N-SH	12,12	11,11	7,10	8,13	14,18	7,10	X,X	8,11	11,11	-
1.00(36/36)	HTB10	SK-N-SH	12,12	11,11	7,10	8,13	14,18	7,10	X,X	8,11	11,11	-
0.67(24/36)	686	UPCI-SCC-111	12,12	11,13	9,10	9,12	16,18	9,10	X,X	9,11	11,11	-

Disclaimer: STR data Reported relate only to the samples received and tested at our testing laboratory Authentication of cell line has been performed based on available cell bank databases. A minimum of eight core STR loci plus amelogenin for sex determination (X or XY) are required for cell line authentication.