



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS EKSPRESI CD44 DAN CD24 PADA SEL PUNCA
JARINGAN KANKER PAYUDARA DAN JARINGAN
PAYUDARA NORMAL PADA PAYUDARA YANG SAMA
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK IMUNOFLUORESENSI**

SKRIPSI

**ASHFAR KURNIA
0706197181**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS EKSPRESI CD44 DAN CD24 PADA SEL PUNCA
JARINGAN KANKER PAYUDARA DAN JARINGAN
PAYUDARA NORMAL PADA PAYUDARA YANG SAMA
DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK IMUNOFLUORESENSI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**ASHFAR KURNIA
0706197181**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : ASHFAR KURNIA

NPM : 0706197181

Tanda Tangan :

Tanggal :

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Ashfar Kurnia
NPM : 0706197181
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Analisis Ekspresi CD44 dan CD24 pada Sel Punca Jaringan Kanker Payudara dan Jaringan Payudara Normal pada Payudara yang sama dengan Menggunakan Teknik Imunofluoresensi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Ekstensi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : dr. Budiman Bela, SpMK(K) (.....)
Pembimbing II : Dr. Amarila Malik, M.Si. (.....)
Penguji I : Dr. Yahdiana Harahap, M.S. (.....)
Penguji II : Dr. Maksum Radji, M.Biomed (.....)
Penguji III : Sutriyo, M.Si., Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal :

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana *science* Jurusan Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. dr. Budiman Bela, SpMK(K), selaku dosen pembimbing I yang telah menyediakan waktu, tenaga, pikiran, nasehat dan kesabarannya untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
2. Dr. Amarila Malik, MSi., selaku dosen pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran serta nasehatnya untuk mengarahkan saya dalam penyusunan skripsi ini;
3. dr. Fera Ibrahim, MSc., Ph.D, Sp.MK(K), selaku *Director for Science, Institute of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium IHVCB-UI dan memperoleh data yang saya perlukan dalam penyusunan skripsi ini;
4. Ibu Aroem Naroeni, S.Si., Ph.D., selaku asisten pembimbing yang telah memberikan ilmu, waktu dan tenaga untuk membimbing saya selama penelitian; serta teman-teman laboratorium IHVCB-UI yang telah membimbing saya dengan sabar;
5. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI;
6. Dr. Abdul Mun'im, M.S., selaku Ketua Program Sarjana Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI;

7. Dr. Arry Yanuar, MSi., selaku pembimbing akademis yang telah memberikan bimbingan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Departmen Farmasi FMIPA UI;
8. orang tua (Ayahanda Anwar Saidin dan Ibunda Arnetti) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini; serta kakak, adik dan keluarga saya yang telah memberikan dukungan materildan moril;
9. Sahabat-sahabat saya, rekan-rekan Farmasi UI yang telah banyak membantu saya dan banyak memberikan motivasi serta keceriaannya dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ashfar Kurnia
NPM : 0706197181
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

ANALISIS EKSPRESI CD44 DAN CD24 PADA SEL PUNCA JARINGAN KANKER PAYUDARA DAN JARINGAN PAYUDARA NORMAL PADA PAYUDARA YANG SAMA DENGAN MENGGUNAKAN TEKNIK IMUNOFLUORESENSI.

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 27 Mei 2010

Yang menyatakan

(Ashfar Kurnia)

ABSTRAK

Nama : Ashfar Kurnia
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Ekspresi CD44 dan CD24 pada Sel Punca Jaringan Kanker Payudara dan Jaringan Payudara Normal pada Jaringan Payudara yang sama dengan Menggunakan Teknik Imunofluoresensi

Kanker payudara merupakan kanker terbanyak nomor 1 di Indonesia dan memiliki insiden kematian terbesar. Kanker payudara adalah sekumpulan masa yang heterogen, pertumbuhan masa tersebut disebabkan oleh adanya sel punca kanker payudara. Sel punca kanker payudara memiliki kemampuan untuk berkembang biak, memperbaiki dirinya sendiri dan juga resisten terhadap apoptosis. Pada kondisi normal sel punca payudara normal memiliki reseptor permukaan $CD44^+/CD24^+$, namun pada kondisi keganasannya sel punca kanker payudara mengekspresikan protein permukaan sel $CD44^+/CD24^{-/low}$. Dilakukan penelitian untuk mengetahui proporsi CD44 dan CD24 dengan menggunakan imunofluoresensi. Jaringan kanker payudara dan payudara normal dihancurkan dan diekstraksi selnya dengan menggunakan *colagenase IV* dan disaring dengan saringan filter 40 mikron. Hasil ekstraksi sel normal payudara dan kanker payudara dilakukan pewarnaan dengan menggunakan antibodi pertama, *rabbit-anti-human* CD44 dan *mouse-anti-human* CD24, serta antibodi kedua, *goat-anti-rabbit*-berikatan dengan Rhodamine dan *goat-anti-mouse*-berikatan dengan FITC dalam PBS-BSA 2%. Diperoleh 12 gambaran sel dan intensitas cahaya fluoresensinya. Tidak diperoleh perbedaan signifikan antara sel punca kanker payudara dengan sel punca payudara normal pada intensitas fluoresensi CD44 dan CD24, kemungkinan disebabkan karena telah terjadi metastasis. Serta adanya penurunan nilai intensitas CD44 dengan bertambahnya waktu kultur.

Kata kunci : Sel punca, Sel punca kanker payudara, CD44, CD24, Imunofluoresensi
xiv+63 halaman : 13 gambar; 5 tabel
Bibliografi : 39 (1985-2010)

ABSTRACT

Name : Ashfar Kurnia
Study Program : Pharmacy
Title : Analysis Expression of CD44 and CD24 at Breast Cancer Stem Cell Tissue and Normal Breast Tissue at Same Breast Tissue with Immunofluorescence Technique

Breast cancer is the most number one cancer in Indonesia and has the greatest incidence of death. Breast cancer is a heterogeneous collection period, the growth was caused by the presence of breast cancer stem cells. Breast cancer stem cells have the ability to reproduce, improve themselves and also resistant to apoptosis. In normal conditions of normal breast stem cells have surface receptors $CD44^+ / CD24^+$, but on condition ferocity of breast cancer stem cells express cell surface proteins $CD44^+ / CD24^{-/low}$. Conducted research to determine the proportion of CD44 and CD24 using immunofluorescence. Breast cancer tissue and normal breast cells are destroyed and extracted using collagenase IV and filtered with 40 micron filter. Results of extraction of normal breast cells and breast cancer conducted by using first antibody staining, rabbit-anti-human CD44 and mouse anti-human-CD24, as well as the second antibody, goat-anti-rabbit-bind-rhodamine and goat anti-mouse-binding with FITC in PBS-BSA 2%. Obtained 12 images of cells and the intensity of fluorescence light. Not obtained significant differences between breast cancer stem cells with normal breast stem cells in the fluorescence intensity of CD44 and CD24, possibly due to metastasis has occurred. And an impairment of CD44 intensity with increasing time of culture.

Key word : Stem cell, Breast cancer stem cell, CD44, CD24, Immunofluorescence
xiv+63 pages : 13 pictures; 5 tables
Bibliography : 39 (1985-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Kanker Payudara	5
2.2 Sel Punca.....	6
2.2.1 Definisi Sel Punca.....	6
2.2.2 Jenis Sel Punca.....	6
2.3 Sel Punca Kanker Payudara	7
2.4 Imunologi	9
2.4.1 CD44.....	11
2.4.2 DD24.....	11
2.5 Imunofluoresensi.....	12
3. BAHAN DAN CARA KERJA	17
3.1 Lokasi Penelitian.....	17
3.2 Persetujuan Etis.....	17

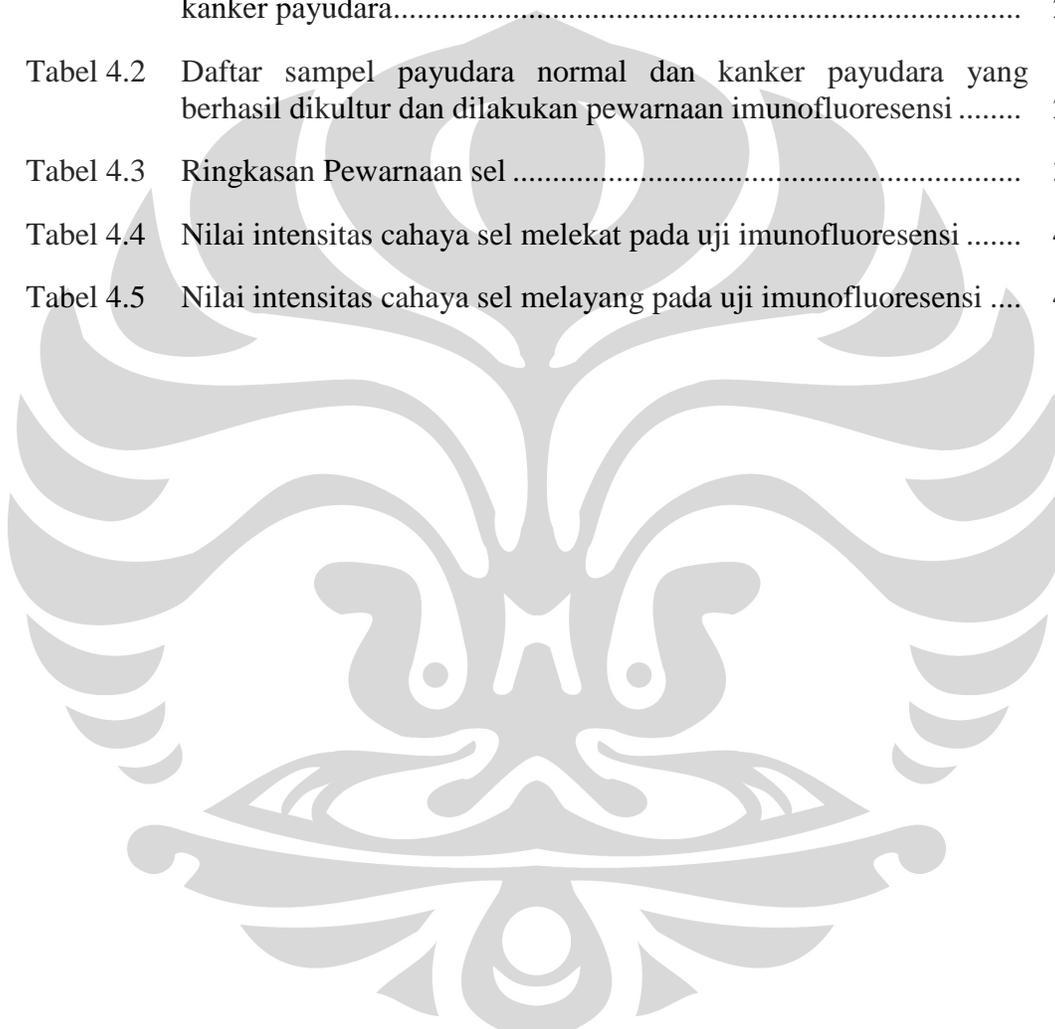
3.3	Alat dan Bahan yang digunakan	17
3.3.1	Sampel.....	17
3.3.2	Antibodi yang digunakan	17
3.3.3	Alat.....	18
3.4	Cara Kerja	18
3.4.1	Proses Pengambilan Sampel	18
3.4.2	Isolasi Sel Normal dan sel Kanker Payudara	19
3.4.3	Kultur Sel	19
3.4.3.1	Persiapan Media Kultur Sel	19
3.4.3.2	Pelaksanaan Kultur Sel	20
3.4.4	Pewarnaan Sel	20
3.4.4.1	Persiapan Media.....	20
3.4.4.2	Persiapan Larutan Antibodi	21
3.4.4.3	Jenis Sel yang akan diberi Antibodi.....	21
3.4.4.4	Pelaksanaan Pewarnaan Sel	21
3.4.4.4.1	Penyiapan <i>Cover Slip</i> pada Sel Melayang	21
3.4.4.4.2	Penyiapan <i>Cover Slip</i> pada Sel Melekat	22
3.4.4.4.3	Fiksasi pada Sel Melekat dan Sel Melayang.	22
3.4.4.4.4	Pemberian Antibodi pada Sel Melekat dan Melayang.....	22
3.4.4.4.5	Pewarnaan Sel Melayang yang dimodifikasi	23
3.4.5	Identifikasi Sel	24
3.4.5.1	Penentuan <i>Cut Off</i>	24
3.4.5.2	Melihat Sel	24
3.4.5.3	Mengolah Data	24
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1	Hasil Ekstraksi Sel dari Jaringan Payudara.....	25
4.2	Hasil Kultur sel payudara.....	25
4.3	Hasil Uji Imunofluoresensi dari sel kultur	28
4.3.1	Hasil Sel Melekat	30
4.3.2	Hasil Sel Melayang	41
4.3.3	Hasil Sel Melayang yang dimodifikasi	43
4.4	Nilai Intensitas Cahaya Rata-rata.....	45
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1	Kesimpulan	50
5.2	Saran	51
	DAFTAR REFERENSI	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Fluorescein isothiocyanate.....	13
Gambar 2.2	Struktur Rhodamine	14
Gambar 4.3	Tampilan sel kanker payudara dan sel payudara normal dalam kultur secara <i>in vitro</i>	28
Gambar 4.4	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS3-Normal sel melekat	31
Gambar 4.5	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS7-Normal dan Kanker sel melekat.....	33
Gambar 4.6	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS8-Normal dan Kanker sel melekat.....	35
Gambar 4.7	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS9-Normal dan Kanker sel melekat.....	37
Gambar 4.8	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS14-Normal dan Kanker sel melekat	39
Gambar 4.9	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS10-Normal dan Kanker sel melayang.....	42
Gambar 4.10	Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS9-Kanker sel melekat.....	44
Gambar 4.11	Grafik intensitas fluoresensi CD44 dan CD24.....	46
Gambar 4.12	Grafik rasio intensitas fluoresensi CD44 dibandingkan terhadap kontrol	47
Gambar 4.13	Grafik rasio intensitas fluoresensi CD24 dibandingkan terhadap kontrol	47

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Daftar perolehan sampel jaringan payudara normal dan jaringan kanker payudara.....	26
Tabel 4.2	Daftar sampel payudara normal dan kanker payudara yang berhasil dikultur dan dilakukan pewarnaan imunofluoresensi	27
Tabel 4.3	Ringkasan Pewarnaan sel	30
Tabel 4.4	Nilai intensitas cahaya sel melekat pada uji imunofluoresensi	45
Tabel 4.5	Nilai intensitas cahaya sel melayang pada uji imunofluoresensi	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sertifikat Uji Etik	55
Lampiran 2 Sertifikat antibodi pertama <i>rabbit anti CD44</i>	56
Lampiran 3 Sertifikat antibodi pertama <i>mouse anti CD24</i>	79
Lampiran 4 Sertifikat antibodi kedua <i>goat anti rabbit-rhodamine</i>	61
Lampiran 5 Sertifikat antibodi kedua <i>goat anti mouse-FITC</i>	64
Lampiran 6 Diagram Metode Pewarnaan Sel	66
Lampiran 7 Diagram Metode Pewarnaan Sel yang dimodifikasi	67

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Kanker payudara banyak dijumpai di Indonesia khususnya pada wanita, sejak tahun 1988-1991 kanker payudara merupakan kanker terbanyak kedua setelah kanker serviks (Haryana dan Soesatyo, 1995, h.52; Tjindarbuni dan Mangunkusumo, 2002, h.18). Namun pada tahun 2005 hingga kini kanker payudara menempati posisi pertama pada kasus kanker di Indonesia (Depkes RI, 2007, h.52). Kanker adalah suatu kondisi dimana sel telah kehilangan pengendalian dan mekanisme normalnya, sehingga mengalami pertumbuhan yang tidak terkontrol dan dapat menginvasi serta bermetastasis ke jaringan lain disekitarnya (Diananda, 2008, h.16).

Selama bertahun-tahun para peneliti berusaha mencari tahu dan mencoba memahami bagaimana sel dan organ tubuh manusia mampu memperbaiki diri sedangkan sel dan organ-organ lainnya tidak dapat memperbaharui dirinya. Sekarang pencarian itu difokuskan pada sel induk atau sel punca. Sel punca adalah jenis sel khusus dengan kemampuan ulang membentuk dirinya dan pada saat yang bersamaan mampu membentuk dirinya menjadi sel yang terspesialisasi. Sel-sel ini merupakan kumpulan sel yang dapat ditemukan pada semua tahap perkembangan dari mulai embrio masa *pre-implantasi* sampai dengan masa dewasa. Terdapat dua kelompok sumber utama sel punca menurut sumbernya yaitu *Embryonic Stem Cell* (ESC) yang diisolasi dari *inner cell mass* embrio, dan *Adult Stem Cell* (ASC). ASC yang diisolasi dari berbagai jaringan tubuh telah menjadi alternatif pilihan sebagai sumber sel punca yang lebih mudah untuk diaplikasikan dalam terapi *regenerative*, terapi berbasis sel, maupun penelitian di bidang keilmuan dasar sel punca itu sendiri. Selain bebas dari permasalahan etis, ASC juga memiliki potensi diferensiasi yang mirip dengan ESC (The National Academies, n.d., h.19; Aini, 2008, h.64)

Sel memiliki sifat yang unik sehingga dapat dibedakan antara satu sel dengan sel yang lainnya. Perbedaan tersebut antara lain adalah sifat dan fungsinya terhadap tubuh, tentunya berat jenis sel pun berbeda-beda. Dalam satu spesialisasi sel sendiri

juga memiliki perbedaan sifat perlekatan pada dinding kaca atau plastik. Ada yang menempel kuat pada dinding kaca atau plastik disebut sel *adherent* atau sel melekat dan ada pula yang tidak menempel disebut sel *floating* atau sel melayang (Alberts et al., 1994, h.254). Kemungkinan ini berhubungan dengan sifat keganasan maupun kemampuan metastasisnya.

Perbedaan kemampuan tersebut berhubungan dengan reseptor pada permukaan dinding sel. Sebagian besar dinding sel dikelilingi oleh lapisan *lipid bilayer* dan terdapat reseptor yang spesifik, diantaranya adalah molekul permukaan yang disebut *Cluster of Differentiation* (CD). CD adalah molekul permukaan sel yang diekspresikan pada berbagai jenis sel sistem imun (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Terdapat berbagai macam jenis CD tergantung dari spesialisasi sel tersebut. Telah dilakukan penelitian oleh Al-Hajj dkk (2003) mereka melakukan identifikasi molekul permukaan sel payudara pada hewan coba, dan diperoleh bahwa sel payudara hewan coba tersebut mengandung molekul CD44 dan CD24. Pada pemeriksaan dengan menginduksi tikus tersebut dengan agen karsinogenik ternyata diperoleh bahwa CD44-positif (CD44⁺) dan CD24-negatif/sedikit (CD24^{-/low}) (Al-Hajj et al, 2003, h.3983).

Hasil pengobatan kanker payudara sampai saat ini belum memuaskan, diperkirakan 50% penderita dapat disembuhkan apabila pasien segera tanggap dan melakukan pemeriksaan pada stadium dini. Penyebab kanker payudara sampai saat ini juga belum jelas secara pasti, namun diduga ada kerusakan pada gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi. Selain itu faktor imun tubuh seseorang juga sangat mempengaruhi timbulnya kanker tersebut. Sebelum sel berubah menjadi ganas ada semacam mekanisme pertahanan diri atau perbaikan diri pada sel tersebut yaitu menekan terjadinya kanker. Bila laju penekanan ini terlambat atau tidak berfungsi maka akan timbulah keganasan pada sel (Haryana dan Soesatyo, 1995, h.52; Sudiana, 2008, h.53).

Pengobatan kanker yang kita kenal sekarang ini adalah dengan menggunakan kemoterapi. Pengobatan konvensional semacam ini memberikan dampak yang lebih

mengerikan dalam hal efek samping yang ditimbulkan oleh obat konvensional pada pasien, karena kemoterapi akan menyebar dan berpenetrasi pada setiap sel yang ditemuinya termasuk sel normal. Banyak reaksi obat yang tidak dikehendaki muncul pada pengobatan secara konvensional diantaranya alopesia, terganggunya sel sumsum tulang, kerusakan kulit, gangguan gastrointestinal dan lain sebagainya (Ganiswarna, 1995, h.690).

Para peneliti kini sedang mencari cara pengobatan kanker yang lebih efektif dan spesifik pada kanker tersebut dengan memanfaatkan sifat reseptor permukaan sel kanker payudara. Sehingga pada akhirnya akan ditemukan pengobatan berbasis molekuler tertuju hanya pada kanker payudara tanpa mengganggu sel-sel normal lainnya. Dengan begitu insiden kematian akibat kanker akan berkurang dengan berjalannya waktu dan kemajuan perkembangan teknologi kesehatan (Dick, 2003, h.3549).

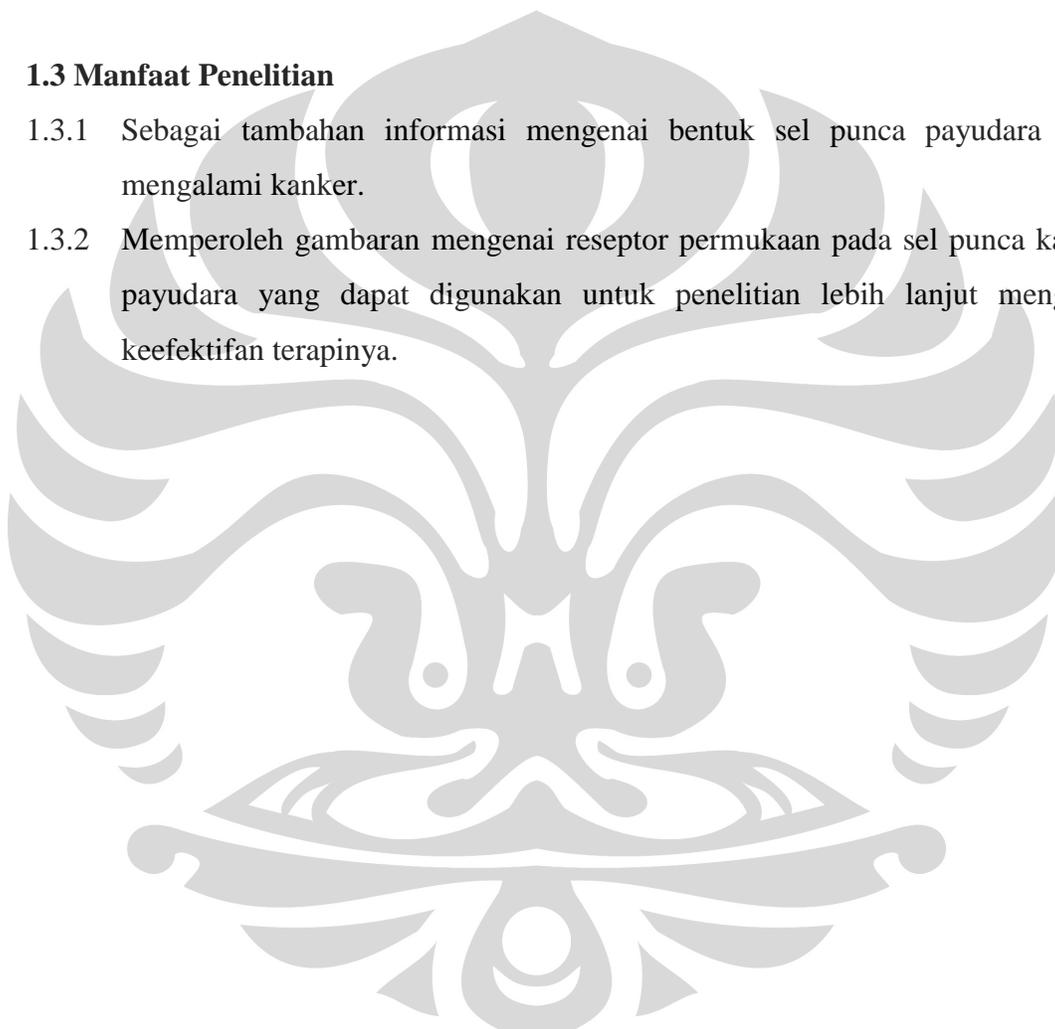
Pada penelitian kali ini akan diamati bentuk sel dengan menggunakan mikroskop fluoresensi guna mendapatkan gambaran sel punca kanker payudara dan sel payudara normal. Pada sampel yang dilakukan pemeriksaan ditentukan terlebih dahulu *sel puncanya*. Selain itu penelitian ini juga menganalisis tumor jinak serta membandingkan tipe sel dan perkembangan kelajuan sel untuk diamati keefektifannya pada terapi.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan gambaran sel punca kanker payudara pada kultur sel jaringan kanker payudara dan jaringan payudara normal dengan melihat pada mikroskop *convocal* fluoresensi serta membandingkan sel bertipe melekat dengan sel bertipe melayang.

1.3 Manfaat Penelitian

- 1.3.1 Sebagai tambahan informasi mengenai bentuk sel punca payudara yang mengalami kanker.
- 1.3.2 Memperoleh gambaran mengenai reseptor permukaan pada sel punca kanker payudara yang dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut mengenai keefektifan terapinya.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan keganasan yang paling banyak diderita pada wanita. Selain penyakit yang didominasi pada wanita (99% kanker payudara terjadi pada wanita), namun penyakit ini juga berhubungan dengan penuaan. Risiko tumbuhnya kanker payudara sebagian besar terpusat pada periode *perimenopause* dan *pascamenopause* (Heffner dan Schust, 2005, h.84).

Penelitian molekuler telah mengidentifikasi beberapa lokus genetik yang sering mengalami kelainan pada *specimen* kanker payudara namun tidak pada jaringan payudara normal. Kelainan yang paling sering meliputi berbagai onkogen yaitu ERBB2 dan c-myc, gen penekan tumor TP53, dan telomerase. Kedua onkogen diperkuat atau diekspresikan secara berlebihan pada sekitar 30% kanker payudara; aktivitas telomerase meningkat pada 80-90% kasus. Jaringan payudara dengan kelainan ERBB2 tampaknya resisten terhadap efek antiestrogen dari tamoksifen namun lebih sensitif terhadap agen kemoterapi standar. Kelainan-kelainan TP53 akan mempengaruhi apoptosis normal, sehingga membuat tumor yang terkena menjadi lebih resisten terhadap kemoterapi dan terapi radiasi. Seperti sebagian besar keganasan, kanker payudara mungkin disebabkan oleh berbagai efek pemicu lingkungan pada jaringan yang secara genetik bersifat rentan. Kerentanan genetik dapat disebabkan oleh mutasi *germinal line* seperti *breast cancer-1* (BRCA1) dan *breast cancer-2* (BRCA2) atau kelainan pada *intrauterine* atau pada saat diferensiasi pada masa pubertas. Pengaruh lingkungan seperti pejanan yang lama terhadap hormon-hormon ovarium dapat meningkatkan mitogenesis payudara, sehingga membuat *epitel duktal mammae* memiliki predisposisi untuk mengalami kerusakan dan transformasi genetik lebih jauh dari sel jinak atipikal menjadi ganas. Pengaruh lingkungan lain seperti kehamilan dapat mempercepat diferensiasi sel payudara dan menurunkan risiko terjadinya respon abnormal terhadap faktor pertumbuhan yang

normal. Peneliti lain juga telah menunjukkan adanya korelasi antara kanker payudara dengan perubahan genetika pada RAS , CCND1, Retinoblastoma-1 (RB1) (Heffner dan Schust, 2005, h.85; Macdonal et al, 2004, h.149-159; Sudiana, 2008, h.51-60).

2.2 Sel Punca

2.2.1 Definisi Sel Punca

Sel punca atau sel induk adalah sel yang tidak/belum terspesialisasi yang mempunyai sifat-sifat yang unik diantaranya kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel lain. Dalam hal ini sel punca mampu berkembang menjadi berbagai jenis sel matang yang berbeda-beda sesuai dengan lingkungannya, misalnya sel saraf, sel otot jantung, sel otot rangka, sel pankreas, dan sel lainnya (Farid, n.d., p.1; Saputra, 2006, p.21). Sel punca juga memiliki kemampuan untuk memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri (*self-renewal*), yaitu sel punca dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel (Reye et al., 2001, h.106).

2.2.2 Jenis Sel Punca

Sel punca memiliki potensi yang luar biasa, yaitu kemampuan untuk berdiferensiasi. Berdasarkan kemampuan berdiferensiasinya sel punca dibagi menjadi 4 bagian yaitu *totipoten*, *pluripoten*, *multipoten*, *unipoten*. *Totipoten* dapat berdiferensiasi menjadi semua jenis sel, misalnya adalah zigot (telur yang telah dibuahi). *Pluripoten* dapat berdiferensiasi menjadi 3 lapisan germinal; *ectoderm*, *mesoderm*, dan *endoderm*, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstraembrionik seperti plasenta dan tali pusat, yang termasuk sel punca ini adalah *Embryonic Stem Cell (ESC)*. *Multipoten* dapat berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel misalnya *hematopoietic cells*. *Unipoten* hanya dapat menghasilkan 1 jenis sel, tetapi berbeda dengan *non-stem cell*, *unipoten stem cell* mempunyai sifat dapat memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri (*self-renewal*) (Saputra, 2006, h.21).

Sel punca dapat diperoleh dalam berbagai jaringan tubuh mana saja. Berdasarkan sumbernya sel tersebut diperoleh pada bagian: zigot, *embrionik stem cell*, fetus, sel punca darah tali pusat, *Adult Stem Cell (ASC)*. Zigot dapat ditemukan pada tahap sesaat setelah sperma bertemu dengan sel telur. *Embrionic Stem Cell* diambil dari *inner cell mass* dari suatu *blastosit* (embrio yang terdiri dari 50-150 sel, kira-kira hari ke-5 pasca pembuahan), *embrionik stem cell* biasanya diperoleh dari sisa embrio yang tidak dipakai pada IVF (*in vitro fertilization*) tapi saat ini telah dikembangkan teknik pengambilan *embrionik stem cell* yang tidak membahayakan embrio tersebut, sehingga dapat terus hidup dan bertumbuh. Fetus dapat diperoleh dari klinik aborsi, mereka diisolasi dari *primordial stem cell* yang diambil dari jaringan gonad pada fetus berusia 5-10 minggu (Shamblott, 2008, h.13726). Sel punca darah tali pusat diambil dari plasenta dan tali pusat segera setelah bayi lahir, sel punca darah tali pusat merupakan jenis *hematopoietic stem cell*. *Adult Stem Cell (ASC)* diambil dari jaringan dewasa antara lain: sumsum tulang (*hematopoietic stem cell* dan *mesenchymal stem cell*) dan jaringan lain seperti susunan saraf pusat, otot rangka, pancreas, payudara dan jaringan lainnya (Saputra, 2006, h.21-22). Sel punca juga memiliki sifat resisten terhadap apoptosis (Harper et al., 2010, h.1; Madjd et al., 2009, h.1).

Pemanfaatan sel punca tidak lain adalah untuk mencari pengobatan alternatif untuk menyembuhkan penyakit yang berhubungan dengan genetik (terapi gen) (Dick, 2003, p.3549; Fillmore dan Kuperwasser, 2007, h.3).

2.3 Sel Punca Kanker Payudara

Sel Punca Kanker payudara merupakan pertumbuhan sel payudara yang tidak dapat dikontrol dan terus tumbuh serta dapat mempertahankan dirinya sendiri. Muncul berbagai macam teori tentang keberadaan sel punca kanker ini, diantaranya sel punca yang mengalami mutasi akibat kehilangan kontrol atas pengendalian dirinya, seperti enzim telomerase (Gil, et al., 2008, h.194), serta *tumor-initiating cell (T-IC)* (Dick, 2003, h.3548). Teori lainnya menduga, sel kanker sendiri mengalami

mutasi yang hebat dan mengaktivasi *survival pathway* yang dimilikinya, sehingga sel hasil mutasi tadi berubah menjadi sel kanker yang *immortal*, dimana fenomena ini dikenal dengan sebutan '*regulation of the self-renewal*' (Al-Hajj et al., 2003, h.3983; Farid, n.d).

Sel tumor juga dapat melindungi dirinya sendiri dengan mekanisme pertahanan terhadap obat kemoterapi yaitu resistensi. Hal ini telah diuji oleh Pajic M dkk. pada tahun 2007, dengan menggunakan kemoterapi anti kanker dan pada pemberian berulang pengobatan dengan *doxorubicin* dan *doxetacel* ternyata membuat sel menjadi resisten (Pajic et al., 2007, h.31).

Pada penelitian yang lain Marangoni dan rekannya pada tahun 2007, melakukan penelitian dengan target sarannya adalah molekul reseptor permukaan pada kanker payudara yaitu CD44 dengan menggunakan antibodi target pada CD44 yaitu H90. Ternyata pertumbuhan kanker payudara menurun dilihat pada analisis *immunohistochemical* (Marangoni et al., 2007, h.68).

Serupa dalam penelitian yang dilakukan oleh Zhang dan rekannya (2007) menunjukkan bahwa pemberian obat secara kemoterapi pada tikus yang diberi kanker payudara ternyata dapat memperparah penyakitnya dengan meningkatnya sel CD44⁺/CD24^{-low} dan meningkatkan kapasitas memperbaharui diri sel kanker tersebut (Zang et al., 2007, h.20). Selain itu hasil metabolit dari obat anti kanker ternyata dapat menimbulkan kanker kedua (Gibson dan Skett, 1991, h.197).

Al-Hajj dan rekan-rekannya telah melakukan penelitian dengan menggunakan tikus sebagai model tempat pertumbuhan sel kanker payudara manusia. Mereka telah mengidentifikasi dan mengisolasi permukaan sel tumor payudara sebagai CD44⁺/CD24^{-low} Lineage⁻ (Al-Hajj et al., 2003, h.3983).

Penelitian yang dilakukan oleh Madjd dan rekan-rekannya (2009) menyebutkan bahwa 82% sampel *immunohistochemistry* CD44 terekspresi pada 146 pasien kanker payudara dan terdeteksi pula protein bcl-2 sebagai agen *anti-apoptosis* (Madjd et al., 2009, h.2).

Berawal dari dugaan dan teori mengenai kemiripan dari sifat-sifat tumor ganas dengan sel punca, seperti kemampuan memperbanyak dan menyesuaikan diri

dari lingkungan baru, membuat banyak ilmuwan berusaha untuk membuktikannya secara ilmiah. Semua upaya dalam memahami sel punca kanker tidak lain adalah untuk mencari terapi andalan menggunakan prinsip-prinsip dasar sel punca, disamping untuk lebih memahami tentang bagaimana sel kanker berkembang biak dan berubah menjadi ganas (Dick, 2003, h.3549; Farid, n.d., h.2).

Sasaran utama pengobatan pada penyakit kanker adalah menghancurkan sel punca kanker payudaranya, jika sel punca kanker payudara telah dihancurkan maka pertumbuhan sel/*proliferasi* akan menjadi normal. Dapat pula dengan memperbaiki gen-gen yang terdapat didalam sel kanker tersebut, misalnya gen supresor, p53, gen inhibitor, p16, dan gen semisalnya namun perlu dilakukan penelitian lebih mendalam (Dick, 2003, h.3549; Gil, et al., 2008, h.194, 198).

2.4 Imunologi

Antibodi adalah protein yang diproduksi sebagai respon atas adanya molekul asing didalam tubuh. Antibodi disintesis oleh sel plasma yang merupakan diferensiasi akhir sel limfosit B, dan bersirkulasi dalam aliran darah dan limfe dimana antibodi akan berikatan dengan antigen asing. Kompleks antigen-antibodi kemudian dihilangkan dari sirkulasi darah melalui proses fagositosis oleh makrofag (Bellanti, 1993, h.173).

Antibodi merupakan kelompok besar dari glikoprotein yang memiliki fungsi struktur dan fungsional. Secara fungsional antibodi memiliki kemampuan untuk berikatan dengan antigen dan sel tertentu atau protein dari sistem imun. Sedangkan secara struktural antibodi tersusun oleh suatu unit karakteristik yang dapat digambarkan sebagai bentuk menyerupai huruf Y. Masing-masing unit Y terdiri dari empat polipeptida, dua polipeptida identik tersebut disebut sebagai rantai berat (*heavy chain*) dan dua lainnya sebagai rantai ringan (*light chain*). Berdasarkan jumlah unit Y dan tipe polipeptida rantai berat yang dimiliki, antibodi dibagi menjadi lima kelas, yaitu immunoglobulin (Ig) G, IgM, IgA, IgE dan IgD (Bellanti, 1993, h.97).

Menurut Bellanti (1993) dalam bukunya, *Immunology*, Interaksi antara antigen dengan antibodi dapat dibagi menjadi 3 kategori:

1. Primer

Adalah ikatan awal yang terjadi antara antibodi dengan antigen. Dapat terjadi disetiap sisi-sisi antigen. Antibodi ini dapat diberi label dengan menggunakan *marker* tertentu sehingga dapat divisualisasikan. Salah satu teknik yang biasa digunakan dalam interaksi ini adalah imunofluoresensi.

2. Sekunder

Merupakan klanjutan dari interaksi primer. Pada proses ini prinsipnya adalah reaksi pengendapan. Reaksi ini terjadi apabila jumlah antigen dan antibodi mengalami kondisi ekivalen. Salah satu teknik yang biasa digunakan adalah uji aglutinasi.

3. Tersier

ialah proses penghancuran antigen oleh perantara makrofag. Interaksi ini terjadi didalam tubuh. Belum ditemukan teknik yang sesuai untuk memvisualisasikan secara *in vitro*.

Sel tubuh kita dapat mengekspresikan protein yang tidak dikenal pada permukaan sel bila sel tersebut mengalami kerusakan atau mengalami gangguan perkembangannya (Bellanti, 1993, h.97). Seperti penelitian yang dilakukan oleh Al-Hajj dan rekan-rekannya pada tahun 2003, mereka menginjeksikan *human breast cancer initiating cell* kedalam lapisan lemak payudara dari *nonobase diabetic/severe combined immunodeficient* (NOD/SCID), sehingga muncullah antigen spesifik yaitu CD44, CD24, B38.1 dan epitel spesifik antigen ESA (Al-Hajj et al, 2003, h.3983).

2.4.1 CD44

Molekul CD44 adalah glikoprotein transmembran, sebuah asam, protein sulfat yang mengandung banyak residu fosfoserin dan beberapa ikatan disulfide. Molekul glikoprotein ini sangat berguna untuk mengubah inti protein dari 37-kDa yang banyak mengandung glikosilasi dari ikatan gula N- dan O- untuk membuat produk protein dengan berat 85-90-kDa dan kadang-kadang terjadi ikatan kondroitin sulfat untuk membentuk protein 180-220-kDa dari *gel sodium dedosil sulfat* (Bolodeoku, J, n.d., h.189).

Gen CD44 manusia terletak pada lengan pendek kromosom 11p13. Genetiknya akan mengkodekan tulang punggung protein CD44, yang terdiri dari daerah proksimal ekstraseluler, daerah transmembran dan daerah sitoplasma. CD44 memainkan peranan penting dalam *cell mediated immunity*, resirkulasi limfosit, aktivasi sel T, adhesi ke sel lainnya dan matriks intraseluler, sebagai metabolisme *hyaluronida*, transduksi sinyal melewati membran sel, dan sekresi faktor pertumbuhan. Ekspresi berlebihan pada gen ini terjadi pada keganasan dan kemampuan metastasis sel kanker. Seperti yang telah dilakukan pada percobaan dengan menggunakan tikus yang menunjukkan peningkatan ekspresi CD44 pada pembentukan tumor non-metastasis (Azamris et al, 2003, h.28; Bolodeoku, n.d., h.189).

2.4.2 CD24

Molekul CD24 adalah suatu glikoprotein, *glycocyl-phosphatidil-inositol* (GPI). Molekul ini diekspresikan pada sel hematopoietik dan sel non-hematopoietik. Glikoprotein ini terdiri dari 27-35 asam amino dengan setengah dari asam aminonya adalah serin dan treonin. Serin dan treonin merupakan tempat yang potensial untuk ikatan O-glikosilasi dan asparaginasi memberikan potensi untuk berikatan N-glikosilasi. CD24 manusia memiliki struktur yang tidak biasa dengan inti hanya memiliki 31 asam amino. Molekul CD24 diekspresikan pada saat regenerasi jaringan. Molekul ini akan diekspresikan secara berlebihan pada keadaan *hematological*

malignancies dan pada tumor padat seperti gastrik, renal, nasofaring, hepatoseluler, kolon dan kanker paru-paru (Motari et al., 2009, h.2). Penelitian yang dilakukan oleh Al-Hajj dan rekan-rekannya menunjukkan bahwa CD24 tidak diekspresikan atau sedikit diekspresikan pada kanker payudara (Al-Hajj et al, 2003, h.3983).

2.5 Imunofluoresensi

Fluoresensi adalah peristiwa dimana energi yang diserap suatu benda dikembalikan kedalam bentuk energi yang lain. Tabrakan dengan molekul menyebabkan kehilangan energi tersebut dalam bentuk panas. Kehilangan ini mungkin hanya sebagian, ke tingkat vibrasi terendah pada *excited state*, dan sisanya dilepaskan dalam bentuk radiasi dengan energi yang lebih kecil atau panjang gelombang yang lebih tinggi. Radiasi ini yang disebut fluoresensi (Handojo, 2003, h.45).

Ada tiga tahapan mekanisme agar fluoresensi dapat terjadi, yaitu *Excitation*, *Excited-State Lifetime*, dan *Fluorescence Emission* (Handojo, 2003, h.47).

1. Tahap 1 : *Excitation*

Suatu foton energi cahaya ($h\nu_{EX}$) yang diberikan dari sumber cahaya lampu atau laser kemudian energi tersebut diserap oleh fluorofor, sehingga terjadi eksitasi elektron didalamnya.

2. Tahap 2 : *Excited-State Lifetime*

Eksitasi tersebut memiliki waktu yang terbatas (biasanya 1-10 nanodetik). Selama masa ini fluorofor mengalami perubahan konformasi dan mengalami interaksi dengan lingkungan sekitarnya. Reaksi ini memiliki dua hal yang penting. Pertama energi yang dipancarkan sebagian akan dihamburkan, sehingga terjadi penurunan energi eksitasi dari fluorofor pada keadaan mula-mula. Kedua tidak semua molekul akan tereksitasi oleh penyerapan energi.

3. Tahap 3 : *Fluorescence Emission*

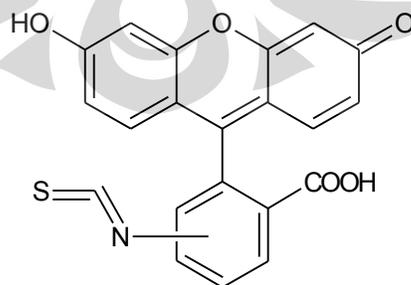
Energi foton yang dipancarkan, mengembalikan fluorofor ke dalam keadaan awalnya. Seharusnya energi akan hilang selama *excited-lifetime*, melainkan energi akan melemah maka akan terjadi peningkatan panjang gelombang. Perbedaan energi tersebut disebut dengan pergeseran stokes. Kemudian perbedaan energi tersebut akan terdeteksi oleh alat.

Pada tahun 1944, Albert Coons menunjukkan bahwa antibodi dapat diberi label dengan suatu molekul yang berfluoresensi. Molekul fluorofor dapat menyerap satu panjang gelombang dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang lain. Jika molekul antibodi diberi label dengan pewarna fluoresensi atau fluorokrom maka akan dapat dideteksi oleh emisi cahaya berwarna ketika tereksitasi oleh cahaya pada panjang gelombang yang sesuai (Goldsby, 1992, h.593).

Ada beberapa fluorofor yang dewasa ini sering dipakai sebagai label dalam uji imunofluoresens atau imunoasai fluoresens, diantaranya: (Handojo, 2003, h.47; Goldsby, 1993, h.594).

1. *Fluorescein isothiocyanate*

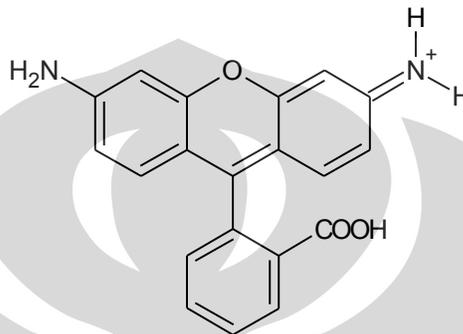
Secara kimiawi stabil, mempunyai efisiensi kuantum 90%, dengan jarak pergeseran stokes sepanjang 26 nm dan dengan waktu hidup fluoresens selama 5 nano detik. Fluoresensinya berwarna hijau apel. Waktu hidup fluoresens dari suatu fluorofor adalah waktu yang dibutuhkan oleh fluorofor tersebut untuk menghilang dari penglihatan bila tidak ada energi eksitasi lagi.



Gambar 2.1 Struktur *Fluorescein isothiocyanate*

2. *Rhodamine isothiocyanate*

Secara kimiawi stabil mempunyai efisiensi kuantum mendekati 70%, dengan jarak pergeseran stokes sepanjang 35 nm dan dengan waktu hidup fluoresens selama 3 nano detik. Fluoresensinya berwarna merah.



Gambar 2.2 Struktur *Rhodamine*

3. *Umbelliferone*

Secara kimiawi stabil dengan jarak pergeseran stokes sepanjang 70 nm. Data yang lain belum diketahui oleh karena jarang dipakai.

4. *Lanthanide Chelates*

Mempunyai energi pancaran yang sempit, dengan jarak pergeseran stokes lebih dari 270 nm, dengan efisiensi kuantum yang umumnya rendah dan dengan waktu hidup fluoresens 10-1000 mikrodetik

Diantara berbagai macam fluorofor tersebut, *Fluorescein* dan *Rhodamine* adalah yang paling sering dipakai, sedangkan *Lanthanide Chelates* belakangan ini baru mulai dipakai (Handojo, 2003, h.47; Goldsby, 1993, h.594).

Fluorescein isothiocyanate merupakan label pilihan untuk uji imunofluoresens atau imunoasai fluoresens. Salah satu hambatan dalam penggunaan *Fluorescein* dan *Rhodamine* sebagai label dalam assay yaitu jarak pergeseran stokes yang relatif kecil (Handojo, 2003, h.47).

Uji imunofluoresensi mempunyai tiga tahap yang berurutan sebagai berikut:

1. Antibodi atau antigen diikatkan atau dikonjugasikan pada bahan fluoresens,
2. Konjugat tersebut kemudian direaksikan dengan lawan imunnya yang sudah diketahui,
3. Hasil reaksi tersebut selanjutnya dilihat di bawah mikroskop fluoresens.

Suatu konjugat sedikitnya harus memenuhi beberapa syarat sebagai berikut:

1. Reaksinya imunologis dari bahan yang diberi label dan tidak boleh terganggu oleh adanya label tersebut.
2. Pemberian label harus cukup kuat sehingga ikatan tersebut dapat tahan terhadap beberapa kondisi fisik maupun kimiawi yang mungkin ditemui dalam pelaksanaan imunoassay.
3. Cat yang dipakai untuk memberi label tidak boleh kehilangan kemampuannya untuk berfluoresensi selama prosedur pelaksanaan imunoassay tersebut di atas.

Imunoasai ini banyak dipakai untuk menentukan antigen atau bahan tertentu yang tidak diketahui. Antigen yang akan ditentukan difiksasi pada suatu gelas objek atau slide khusus. Biasanya dipakai aseton untuk fiksasi tersebut dan dikeringkan di udara dengan *hair blower*. Setelah dicuci, ditambahkan antibodi yang telah diketahui dan diberi label dengan bahan fluoresens (konjugat). Inkubasi dilakukan dalam suatu tempat yang lembab. Setelah waktu inkubasi slide dicuci dengan suatu larutan penyangga seperti PBS (*phosphate buffer saline*) dan dikeringkan, kemudian dibaca dengan mikroskop fluoresens (Handojo, 2003, h.48).

Pada imunoasai ini, antigen yang telah diketahui difiksasi pada suatu slide kaca lalu ditambahkan beberapa tetes serum penderita (antibodi). Setelah diinkubasi, slide dicuci dan ditambahkan antihuman globulin berlabel fluorescein (konjugat) (Handojo, 2003, h.48).

Setelah waktu inkubasi, slide dicuci dan dilihat dibawah mikroskop fluoresens. Bila dalam serum terdapat antibodi terhadap antigen tersebut, akan tampak adanya fluoresensi (Handojo, 2003, h.48).

Imunoasai ini juga dipakai untuk penentuan adanya antibodi dalam serum penderita. Pada imunoasai ini antigen yang diketahui dan difiksasi pada slide, dicampur dengan serum penderita (antibodi). Setelah waktu inkubasi, slide dicuci dan ditambahkan komplemen yang diberi label dengan fluorescein (Handojo, 2003, h.48).

Setelah waktu inkubasi kedua, slide dicuci lagi dengan PBS lalu dilihat dibawah mikroskop fluoresens. Bila didalam serum penderita terdapat antibodi terhadap antigen tersebut maka antigen tersebut akan tampak berfluoresensi (Handojo, 2003, h.49).

Keuntungan cara ini dibandingkan dengan uji imunofluoresens yang tidak langsung atau uji fiksasi komplemen yang klasik ialah:

- a. Dapat dikerjakan baik dengan komplemen hemolitik maupun non-hemolitik
- b. Amat sedikit terganggu oleh adanya faktor anti – komplemen
- c. Lebih mudah untuk memperoleh komplemen serum yang bebas dari antibodi yang lain daripada membuat antihuman globulin (AHG) yang bebas dari antibodi yang lain.

Kelamahan Uji Imunofluoresensi (Handojo, 2003, h.58)

- a. Membutuhkan peralatan yang canggih dan mahal
- b. Membutuhkan tenaga yang terlatih
- c. Pelaksanaannya kompleks dan membosankan
- d. Sukar untuk dibuat otomatis
- e. Seorang analisis hanya diperbolehkan untuk membaca sebanyak-banyaknya 25 slide dalam sehari
- f. *Slide* tidak dapat disimpan lama (akan menjadi pudar) dan harus dibaca secepatnya.

BAB 3

BAHAN DAN CARA KERJA

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), Gedung IASTH lantai 8, Jalan Salemba 4, Jakarta Pusat 10430. Penelitian dilaksanakan sejak Januari 2010.

3.2 Persetujuan Etis

Persetujuan etis telah diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2009. Sertifikat dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah jaringan primer sel normal dan kanker payudara, yang diperoleh dari pengangkatan tumor pasien penderita kanker payudara. Pengambilan sampel ini telah memenuhi izin dari Komite Etik. Sampel diperoleh dari Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM) dan Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD) dari bulan Agustus 2009 sampai April 2010.

3.3.2 Antibodi

Antibodi yang digunakan adalah *Rabbit(r)-monoclonal-anti(α)-human(h)-CD44* (rahCD44, nomor klon EPR1013Y; ABCAM), *Mouse(m)-monoclonal-anti(α)-human(h)-CD24* (mahCD24, nomor klon 8.B.76; ABCAM), *Goat(g)-anti(α)-rabbit(r)* yang telah berikatan dengan Rhodamine (gar-Rhod, ABCAM), *Goat(g)-anti(α)-mouse(m)* yang telah berikatan dengan *Fluorescence Isothiocyanate (FITC)* (gam-FITC, ABCAM). *Certificate of Compliance* dapat dilihat pada lampiran 2, 3, 4 dan 5.

3.3.3 Alat

Dalam proses ekstraksi sel dari jaringan payudara dan kultur sel menggunakan alat sebagai berikut, *Laminar Air Flow* [Esco®, USA], CO₂ Inkubator IL-60160-1491 [Barnstead®, USA], Mikroskop Olympus CKX-41 SF dengan Lensa WHB-10X/20 [Olympus®, Japan], Sentrifuge, Cawan Petri 100 mm [Sigma Aldrich®, USA], Pinset, Pisau Scalpel, Saringan Nilon diameter saringan 40 µm [Falcon®], Pipet *Serologic* [Betcon®], Pompa Pipet, Pipet Tips Steril 1000 µl; 200 µl [Axigen®], Tabung 50 ml; 15 ml [Falcon®], Sel Kultur Flask 150 cm² [Sigma Aldrich®, USA], *Haemocytometer Chamber* [Sigma Aldrich®, USA].

Dalam proses pewarnaan sel menggunakan alat sebagai berikut, Mikroskop Konfokal Fluoresensi Olympus IX-81 [Olympus®, Japan], *Laminar Air Flow* [Esco®, USA], Sentrifuge, Pipet Tips Steril 1000 µl; 200 µl [Axigen®], *Covered Glass circular*, *Slide Glass*, Pinset, Plat Sumur 12 lubang [Falcon®], Ependorff [Falcon®].

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Proses Pengambilan Sampel

Pada pengambilan sampel ini ada tim khusus yang melakukannya, penulis hanya menerima informasi dari tim khusus tersebut.

Sampel jaringan kanker payudara dan jaringan payudara normal diperoleh dalam waktu kurang lebih 1 jam setelah operasi pengangkatan tumor. Dengan menggunakan metode IHVCB (n.d). Jaringan tersebut dimasukkan ke dalam tabung dan direndam dalam larutan RPMI-1640 steril (SIGMA®).

Untuk hasil yang optimal, sampel ditranspor sesegera mungkin dengan menggunakan *box* pendingin suhu dari lokasi pengambilan sampel menuju laboratorium IHVCB-UI Fakultas Kedokteran, Salemba, Jakarta, untuk dilakukan isolasi sel dari jaringan.

3.4.2 Isolasi Sel Normal dan Sel Kanker dari Jaringan

Sampel yang telah ditransport dimasukkan ke dalam laboratorium. Proses isolasi sel menggunakan metode IHVCB (n.d. a) dilakukan di dalam *biosafety cabinet* dalam laboratorium *biosafety level 2*. Sampel tersebut dikeluarkan dari tabung dan didisosiasikan secara mekanik dengan gunting dan dihaluskan dengan menggunakan pisau *scalpel* steril diatas cawan petri. Untuk mendapatkan suspensi sel tunggal, potongan tumor yang telah dihaluskan dicampur dengan *Collagenese IV* (SIGMA[®]) lalu dimasukkan kedalam tabung dan diinkubasi dalam inkubator (Barnstead[®] IL 60160-1491, Malrose Park, USA) pada suhu 37°C selama 3-4 jam agar terjadi disosiasi enzimatik. Selanjutnya sampel tersebut didisosiasi secara mekanik dengan 10 ml pipet setiap 15-20 menit. Setelah dilakukan inkubasi, sel disaring dengan filter nilon berdiameter 40 µm dan dicuci dengan *Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)/Fetal Bovine Serum 20% (FBS)* (SIGMA[®]) dan terakhir dicuci 2 kali dengan HBSS. Sebagian sel akan dikultur dalam inkubator dan disimpan dalam nitrogen cair dan sebagian lagi langsung dianalisis (IHVCB, n.d. a).

3.4.3 Kultur Sel

3.4.3.1 Persiapan Media Kultur Sel

Pada penelitian ini, sel kanker dan sel normal payudara membutuhkan media yang sesuai untuk kelangsungan hidupnya. Diperlukan media yang menyerupai kondisi cairan tubuh manusia, yaitu 10% *Fetal Bovine Serum (FBS)* (INVITROGEN[®]) dalam *Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM)* (SIGMA[®]). Sebanyak 43 ml *Inactivated DMEM* di dalam tabung ditambahkan *Penstrep* (GIBCO[®]) sebanyak 500 µl, kemudian tambahkan sebanyak 250 µl Gentamisin (SIGMA[®]), lalu berikan *buffer Sodium-Hepes 1M* (SIGMA[®]) sebanyak 750 µl, dan tambahkan elektrolit *Sodium bicarbonate* sebanyak 500 µl. kocok homogen, kemudian tambahkan FBS sebanyak 5 ml kedalam campuran tersebut lalu kocok homogen secara lembut untuk mencegah timbulnya buih. Dikerjakan pada suhu 25°C. (IHVCB, n.d. a).

3.4.3.2 Pelaksanaan Kultur Sel

Jaringan normal dan kanker payudara dijadikan suspensi sel tunggal dalam *Dulbecco's Modified Eagle's Media (High Glucose)* dan disemaikan kedalam plat kultur dua belas sumur (2,5 ml per pelat kultur) atau dalam botol kultur T80 (10 ml per botol). Medium kultur sel diganti setiap 3-4 hari sekali atau sampai terlihat media menguning kecoklatan dan sel diganti mediumnya setiap 2 minggu. Pada setiap penggantian medium, lapisan yang terbentuk, diinkubasi dengan tripsin (GIBCO[®]) selama 3 menit pada suhu 37°C dan didispersikan dengan pipet menggunakan *gauge needle 23* (TERUMO[®]). Setelah dipastikan pemisahan sel menjadi 4×10^4 sel/ml sebelum disemaikan dalam plat kultur atau botol kultur yang tidak menyebabkan perlekatan sel lalu di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dengan kandungan CO₂ 5% (IHVCB, n.d. a).

3.4.4 Pewarnaan Sel

Pada pewarnaan sel ini pengerjaan dilakukan di dalam *biosafety cabinet level 2* dan menggunakan perlengkapan yang sesuai dengan *Standart Operating Procedure* (SOP) IHVCB-UI. Semua sampel harus dikerjakan secara aseptis, termasuk menggunakan tabung steril, pipet tips steril, hindari terjadinya kontaminasi terhadap sampel.

3.4.4.1 Persiapan Media

Media yang digunakan dalam proses pewarnaan ini adalah *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (GIBCO[®]) steril 1x dan campuran larutan media sekaligus sebagai pembersih yaitu 2% *Bovine Serum Albumine* (BSA) (INVITROGEN[®]) dalam PBS. Dilakukan dalam *biosafety cabinet level 2* (IHVCB, n.d. b).

3.4.4.2 Persiapan Larutan Antibodi

Diasumsikan untuk satu sampel adalah 4 sumur (1 untuk normal positif, 1 untuk normal negatif, 1 untuk kanker positif dan 1 untuk kanker negatif).

- a. Antibodi pertama (rahCD44 dan mahCD24) (ABCAM[®], UK)

Konsentrasi = 1/250 tiap sumur

Maka $1/250 \times 1000 \mu\text{l} = 4 \mu\text{l}$ antibodi (dalam 1000 μl PBS-BSA2%)

(diberikan kepada sampel sel payudara normal dan sampel kanker payudara, control tidak diberikan)

- b. Antibodi kedua yang telah dilabel dengan fluorofor (gam-FITC dan gar-Rhod) (ABCAM[®], UK)

Konsentrasi = 1/250 tiap sumur

Maka $1/250 \times 1000 \mu\text{l} = 4 \mu\text{l}$ antibodi (dalam 1000 μl PBS-BSA2%)

(diberikan kepada kontrol negatif sel payudara normal dan kanker payudara, serta diberikan pada sampel sel payudara normal dan kanker payudara)

3.4.4.3 Jenis Sel yang akan diberi Antibodi

Pada sampel ini terdapat dua jenis sel yaitu sel *floating* atau sel melayang dan sel *adherent* atau sel melekat. Sel *floating* akan melayang pada medium dan tidak dapat melekat kuat sehingga mudah lepas, maka daripada itu diberikan perekat yaitu *poli-l-lysine* 0,1% (SIGMA[®]). Sedangkan sel *adherent* yaitu sel yang melekat dan menjalar sehingga tidak diperlukan perekat.

3.4.4.4 Pelaksanaan pewarnaan sel

3.4.4.4.1 Penyiapan sel pada sel melekat

Untuk sel melekat, proses ini dilalui tanpa menggunakan *poli-l-lysine*. Rendam *cover slip* kedalam alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dikeringkan dengan cara dilewatkan pada api spiritus hingga kering. Lalu *cover slip* dimasukkan ke dalam plat sumur.

3.4.4.4.2 Penyiapan sel pada sel melayang

Langkah awal dalam pewarnaan ini adalah merendam *cover slip* kedalam alkohol 70% selama 5 menit, kemudian dikeringkan dengan cara dilewatkan pada api spiritus hingga kering. *Cover slip* dimasukkan kedalam plat sumur lalu masukkan kedalamnya *poli-l-lysine* sebanyak 500 µl sebagai perekat sel. Kemudian *cover slip* tersebut di inkubasikan selama 24 jam, lalu buang *poli-l-lysine* tersebut (IHVCB, n.d. b).

3.4.4.4.3 Fiksasi pada sel melekat maupun sel melayang

Sel normal dan sel kanker dimasukkan ke dalam plat sumur yang telah diberi *cover slip* sebanyak 1000 µl kemudian diinkubasikan selama 24 jam agar sel-sel tersebut melekat pada *cover slip*. Buang medium pertumbuhannya kemudian berikan *formaldehyde* 3,7% sebanyak 500 µl kedalam masing-masing sumur untuk menghentikan pertumbuhan sel tersebut, inkubasikan selama 15-30 menit. Cuci dengan medium PBS agar sisa *formaldehyde* 3,7% hilang, kemudian berikan medium PBS-BSA 2% lalu inkubasikan selama 60 menit (IHVCB, n.d. b).

3.4.4.4.4 Pemberian Antibodi pada sel melekat maupun sel melayang

Buang mediumnya lalu masukkan PBS-BSA2% kedalam tiap-tiap sumur sebanyak 600 µl, kemudian tambahkan larutan antibodi pertama (*rahCD44* dan *mahCD24*) sebanyak 200 µl untuk setiap antibodinya pada semua *cover slip* kecuali pada kontrol negatif diberikan PBS-BSA 2% sebanyak 400 µl, inkubasikan selama 60 menit pada suhu 20°C. Buang antibodi pertama, kemudian cuci dengan medium PBS-BSA 2% sebanyak 3x. Masukkan PBS-BSA 2% kedalam tiap-tiap sumur sebanyak 600 µl, lalu tambahkan larutan antibodi kedua (*gam-FITC* dan *gar-Rhod*) sebanyak 200 µl untuk setiap antibodinya pada semua *cover slip* (pada kontrol negatif dan positif). Kemudian diinkubasikan selama 60 menit pada suhu 20°C. Bilas dengan PBS 1x sebanyak 3x dengan pembilasan terakhir tidak membuang mediumnya. Setiap inkubasi bungkus plat dengan *aluminium foil* (IHVCB, n.d. b).

Berikan *mouwiol* sebanyak 8 μ l pada *slide* kaca yang telah diberi label, pemberian ini dimaksudkan sebagai perekat antara slide dengan *cover slip*. Kemudian letakkan *cover slip* secara terbalik (sel-sel yang menempel menghadap *mouwiol*) lalu masukkan kedalam tempat yang sejuk dan terlindung dari cahaya (bungkus dengan *aluminium foil*), biarkan hingga mengering (IHVCB, n.d. b).

3.4.4.4.5 Pewarnaan Sel melayang yang dimodifikasi

Sampel segar *pasca* ekstraksi dimasukkan kedalam tiga buah endpof kecil (A untuk kontrol, B untuk control negatif, dan C untuk sampel positif) berukuran 1,5 ml. kemudian dilakukan sentrifugasi 1200 rpm selama 10 menit. Buang supernatan, kemudian tambahkan kedalamnya masing-masing 500 μ l formaldehid 3,7%, lakukan homogenisasi secara *up-down*, lalu inkubasi selama 30 menit. Sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1200 rpm. Buang supernatan lalu tambahkan 1000 μ l PBS, homegenkan secara *up-down* setelah itu sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Lakukan pembilasan dengan PBS sebanyak 3 kali.

Pada pemberian ke tiga menggunakan PBS-BSA 2% sebanyak 1000 μ l. Masukkan kedalamnya antibodi pertama (*rahCD44* dan *mohCD24*) sambil dihomogenkan pada endpof C (endpof A dan B tidak diberikan, sebagai kontrol), lalu inkubasikan selama 60 menit. Setelah itu sentrifugasikan 1200 rpm selama 10 menit lalu buang supernatannya. Bilas dengan PBS-BSA 2% sebanyak 3 kali. Kemudian tambahkan antobodi kedua (*gam-FITC* dan *gar-Rhod*) pada endpof B dan C (endpof A tidak diberikan, sebagai kontrol negatif) sambil dilakukan homogenisasi, lalu inkubasikan selama 60 menit. Seteleh itu sentrifugasikan lagi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit lalu buang supernatannya. Bilas dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya masukkan sampel pada endpof A, B, dan C ke dalam masing-masing sumur yang sebelumnya telah diberikan *cover slip* yang telah direndam dengan *poly-l-lysine* selama 1 hari. Inkubasikan selama 1 hari agar sampel sel merekat kuat. Setelah itu angkat *cover slip* dan tempelkan pada *slide*

objek yang telah diberi *mouviol* 8 μ l, letakkan *cover slip* secara terbalik. Biarkan hingga mengering, sekitar 1 hari pada tempat sejuk dan terlindung dari cahaya.

3.4.5 Identifikasi Sel

Identifikasi pewarnaan antibodi dilakukan dengan menggunakan alat *convocal fluorescence microscopy* (OLYMPUS® IX81, JEPANG). Dengan menggunakan perangkat lunak Olympus Fluoview ver. 1.4a. sampel dilihat satu-persatu pada kaca objek. Lakukan pengamatan dalam ruangan gelap.

3.4.5.1 Penentuan *Cut Off*

Penentuan *cut off* dilakukan dengan menyesuaikan panjang gelombang yang dimiliki alat dengan pewarna yang digunakan. Nilai *cut off* adalah nilai intensitas dari cahaya yang dipantulkan pada kontrol negatif. Sampel dengan nilai intensitas lebih besar dari *cut off* dinyatakan sebagai fluoresensi positif, dan sebaliknya sampel dengan nilai intensitas lebih kecil atau sama dengan nilai *cut off* dinyatakan sebagai fluoresensi negatif.

3.4.5.2 Melihat Sel

Masukkan sampel positif, lihat pada mikroskop dengan memasukkan angka intensitas cahaya yang ditetapkan pada nilai *cut off* (untuk sampel normal gunakan nilai *cut off* normal, begitu pula untuk sampel kanker gunakan nilai *cut off* sel kanker). Simpan gambar. Lakukan triplo.

3.4.5.3 Mengolah Data

Gambar yang telah disimpan diolah dengan menggunakan perangkat lunak FV-ASW 1.3 Viewer. Pengolahan dilakukan untuk mendapatkan nilai intensitas dan menandai sel.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi Sel dari Jaringan Payudara

Tahap awal dari penelitian ini adalah mengekstraksi sel kanker payudara dan sel payudara normal dari jaringan payudara. Dengan menggunakan metode ekstraksi maka didapatkan sel yang bebas dari jaringan lain atau paling tidak meminimalisir sel lain yang dapat mengganggu proses pewarnaan. Sel kemudian dikultur dan diberikan medium dalam plat kultur lalu dimasukkan kedalam inkubator pada suhu 37°C dan dengan kandungan CO₂ 5%. Kondisi ini dibuat sedemikian rupa mendekati dengan kondisi tubuh manusia normal (Hagelson dan Miller, n.d., h.4).

Sel kanker payudara dan sel payudara normal diekstraksi sebanyak 16 pasien. Lima belas diantaranya diperoleh dari hasil operasi pengangkatan kanker di Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM), sedangkan satunya berasal dari Rumah Sakit Kanker Dharmais (RSKD). Sampel yang berasal dari RSCM merupakan sel kanker payudara dan sampel yang berasal dari RSKD merupakan Fibro Adenoma Mammae (FAM). Hasil ekstraksi dengan menggunakan metode IHVCB-UI (n.d.), Serta jenis dan tempat diperolehnya dapat dilihat pada tabel 4.1.

Dari 16 sampel jaringan payudara normal dan kanker payudara, semuanya berhasil dilakukan ekstraksi namun pada penyimpanan sel di dalam kultur in vitro hanya beberapa sampel saja yang bertahan hidup. Kondisi ini disebabkan karena adanya kontaminasi sampel dengan mikroba dan jamur. Kami melakukan proses penyegaran sel dengan memberikan antimikroba *penisilin-streptomisin* ke dalam plat kultur dan dilakukan pemisahan sel dengan mikroba yang telah dimatikan tersebut dengan cara membilasnya dengan medium. Namun tetap hanya beberapa sel saja yang bertahan hidup, dapat dilihat pada table 4.2.

Tabel 4.1 Daftar Perolehan Sampel Jaringan Payudara Normal dan Jaringan Kanker Payudara

No.	Nama Sampel	Jenis Sampel	Asal Sampel
1.	CS01	Kanker Payudara	RSCM
2.	CS02	Kanker Payudara	RSCM
3.	CS03	Kanker Payudara	RSCM
4.	CS04	Kanker Payudara	RSCM
5.	CS05	Kanker Payudara	RSCM
6.	CS06	Kanker Payudara	RSCM
7.	CS07	Kanker Payudara	RSCM
8.	CS08	Kanker Payudara	RSCM
9.	CS09	Kanker Payudara	RSCM
10.	CS10	Kanker Payudara	RSCM
11.	CS11	Kanker Payudara	RSCM
12.	CS12	Kanker Payudara	RSCM
13.	CS13	Kanker Payudara	RSCM
14.	CS14	Kanker Payudara	RSCM
15.	CS15	Kanker Payudara	RSCM
16.	CS16	Fibro Adenoma Mammae	RSKD

Keterangan: CS: Clinical Sample

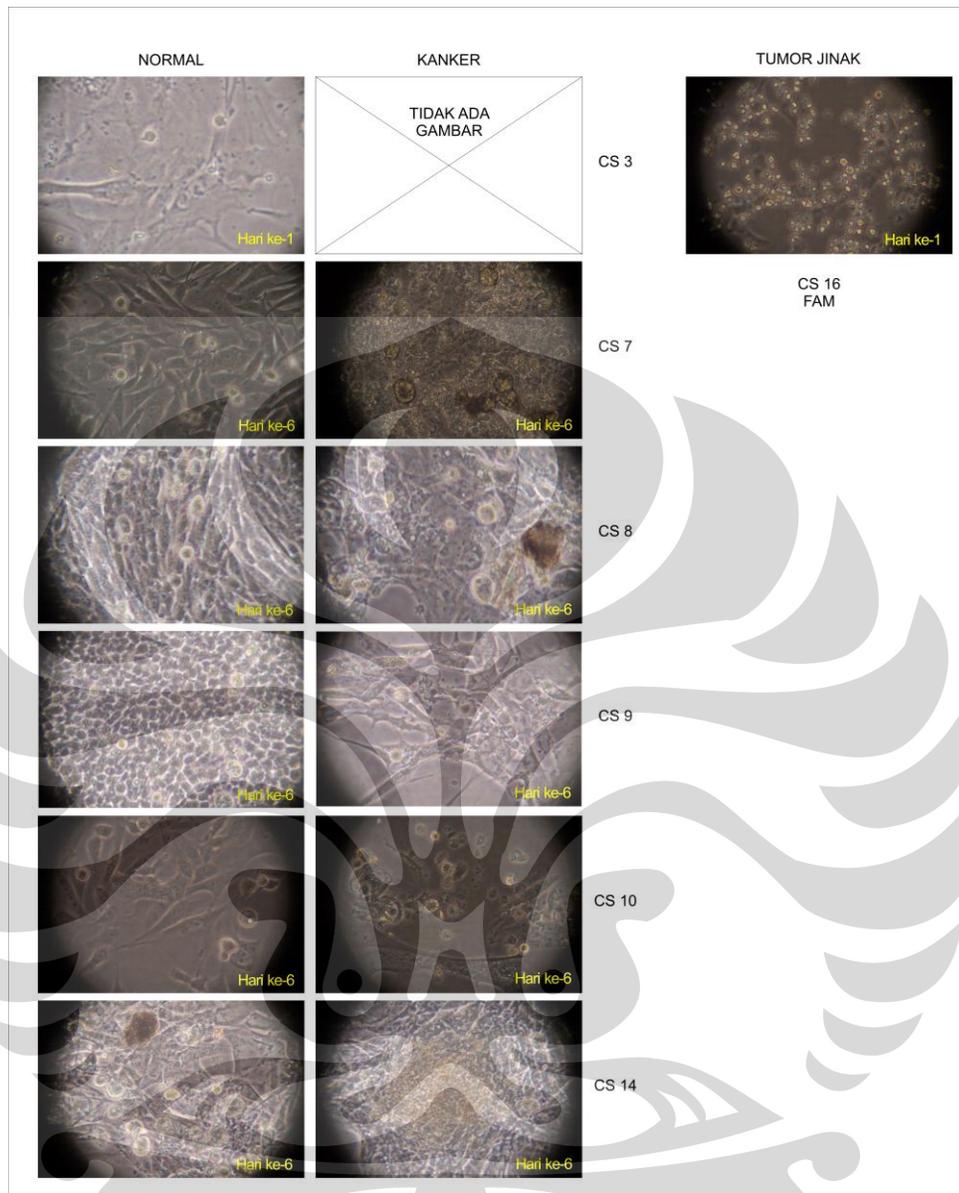
4.2 Hasil Kultur Sel Payudara

Sel adalah unit terkecil dari suatu sistem kehidupan yang masih dapat melakukan aktivitasnya secara individual, asalkan saja komponen-komponen (organel) sel tersebut masih utuh (Sudiana, 2008). Sel dapat hidup secara *in vitro* dengan syarat nutrisi yang diperlukan sel untuk tumbuh tersedia (Putra, 1997). Maka dengan begini sel *pasca* ekstraksi dapat disimpan sejenak tanpa harus langsung melanjutkan proses pewarnaan. Dari hasil ekstraksi sel tersebut yang kemudian dikultur, tidak semua berhasil hidup dalam plat kultur. Maka sampel yang dapat dianalisis dengan menggunakan imunofluoresensi hanya yang bertahan hidup dalam kultur yaitu dua belas sampel. Daftar sel tersebut dapat dilihat pada table 4.2.

Tabel 4.2 Daftar Sampel Payudara Normal dan Kanker Payudara yang Berhasil Dikultur dan Dilakukan Pewarnaan Imunofluoresensi

No.	Nama Sampel	Sel Normal	Sel Kanker
1.	CS01	-	-
2.	CS02	-	-
3.	CS03	Hidup	-
4.	CS04	-	-
5.	CS05	-	-
6.	CS06	-	-
7.	CS07	Hidup	Hidup
8.	CS08	Hidup	Hidup
9.	CS09	Hidup	Hidup
10.	CS10	Hidup	Hidup
11.	CS11	-	-
12.	CS12	-	-
13.	CS13	-	-
14.	CS14	Hidup	Hidup
15.	CS15	-	-
16.	CS16	Tidak dilakukan	Langsung diwarnai

Sebelas sampel yang berhasil hidup dalam plat kultur dijaga dan dipertahankan kehidupannya, sedangkan sampel yang ke dua belas, yaitu CS16 (Fibroadenoma mammae) tidak dilakukan kultur *in vitro* namun langsung dilakukan pewarnaan setelah selesai diekstraksi, karena kami bertujuan menganalisis sel segar sesaat setelah ekstraksi. Dengan beranggapan bahwa sel dapat bernetastasis dan mereplikasi dirinya menjadi sama dengan sel induknya. Hasil morfologi sel dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.3 Tampilan Sel Kanker Payudara dan Sel Payudara Normal dalam Kultur secara *in vitro*

4.3 Hasil Uji Imunofluoresensi dari Sel Kultur yang Diperoleh

Mikroskop imunofluoresensi merupakan mikroskop konfokal modern yang memiliki kesensitifan cahaya dan warna yang terlihat lebih jelas dibandingkan dengan mikroskop konvensional (Samwogerere dan Weeks, 2005). Kami

menggunakan alat dengan panjang gelombang yang tersedia adalah 488 nm, 543 nm, dan 633 nm. FITC akan menyerap energi pada panjang gelombang 488 nm, sedangkan Rhodamine akan menyerap energi pada panjang gelombang 543 nm kemudian mereka tereksitasi dan memantulkan pada panjang gelombang yang lebih tinggi. Keduanya dapat digunakan secara bersamaan karena perbedaan panjang gelombang pada saat tereksitasi cukup jauh sehingga tidak terjadi kesamaan warna fluoresensi pada saat emisi.

Beberapa reseptor permukaan pada sel punca kanker payudara yang dapat digunakan untuk marker permukaan salah satunya adalah glikoprotein CD44 dan CD24 (Al-Hajj et al, 2003). Glikoprotein ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi sel punca kanker payudara dari sel-sel lainnya, dengan ciri khasnya adalah peningkatan secara drastis ekspresi CD44 pada sel kanker payudara. Berdasarkan hal ini digunakanlah antibodi yang dapat mengikat reseptor glikoprotein diatas dengan antibodi yang dikonjugasikan dengan fluorofor.

Setelah sel berhasil diekstraksi dan bertahan dalam kultur *in vitro*, kemudian sel tersebut dilakukan pewarnaan. Pada plat sumur untuk kultur sel, bagian suspensinya dilakukan pewarnaan sel melayang dan pada bagian bawah dilakukan pewarnaan sel melekat. Pada pewarnaan imunofluoresensi sebagian besar berhasil dilakukan, namun ada beberapa yang gagal. Kegagalan dalam pewarnaan disebabkan karena sebagian besar sel terbuang pada proses pembilasan sehingga hampir tidak ada sel yang dapat diamati, hal ini terjadi hanya pada sel bertipe melayang.

Sel dapat memiliki sifat antara lain melekat dan kurang dapat melekat pada dinding permukaan, maka kami memisahkan analisisnya menjadi dua, yaitu pewarnaan sel melekat dan sel melayang. Peristiwa melekatnya sel kemungkinan disebabkan karena adanya glikoprotein CD44 yang berfungsi sebagai perlekatan dengan dinding disekitarnya. Dan sel ini dapat menjalar membentuk sel fibroblas yang bertujuan untuk berkomunikasi dengan sel disekitarnya dan mencari makanan.

Tabel 4.3 Ringkasan Pewarnaan Sel

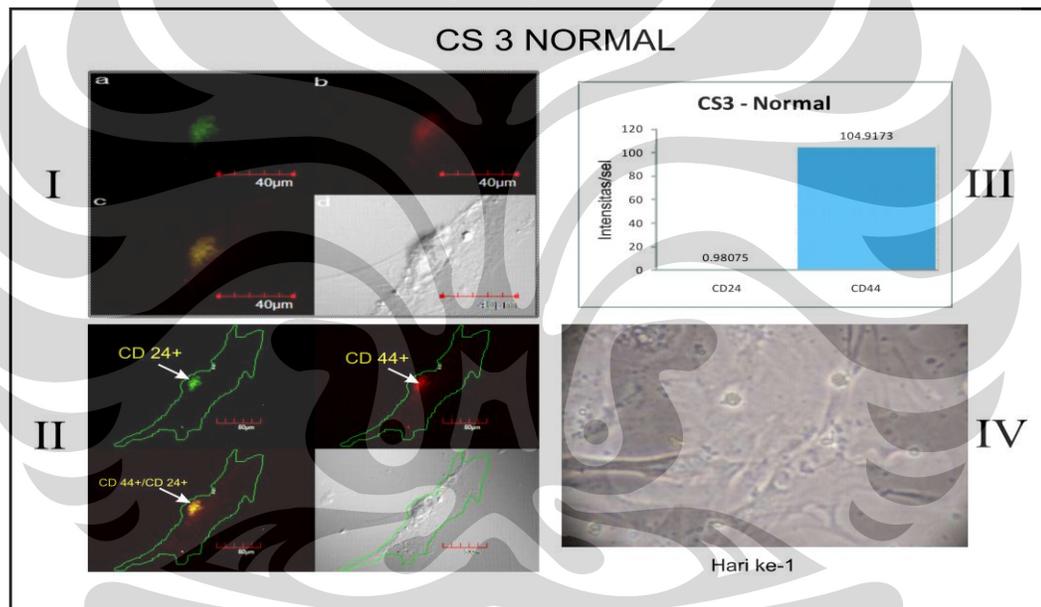
No.	Nama Sampel	Sel Melekat		Sel Melayang	
		Normal	Kanker	Normal	Kanker
1.	CS03	Berhasil	-	Gagal	-
2.	CS07	Berhasil	Berhasil	Gagal	Gagal
3.	CS08	Berhasil	Berhasil	Gagal	Gagal
4.	CS09	Berhasil	Berhasil	Gagal	Gagal
5.	CS10	Gagal	Gagal	Berhasil	Berhasil
6.	CS14	Berhasil	Berhasil	Gagal	Gagal
7.	CS16	-	-	-	Berhasil

4.3.1 Hasil dari sel melekat

Tahap pertama yang dilakukan untuk mewarnai jenis sel ini adalah mengambil selnya dari dinding plat kultur yang telah dikultur selama 1-2 minggu atau sel telah mencapai 4×10^4 sel/ml, dengan cara memberikannya larutan Tripsin sebanyak 3 ml, bila diamati dengan mikroskop cahaya akan tampak seperti mengelupas. Sekitar 5-10 menit kemudian sel tersebut dipindahkan ke dalam plat sumur yang telah diberi *cover slip*. Lalu diinkubasikan selama 24 jam, waktu yang diperlukan untuk melekatnya sel pada dinding *cover slip*. Kemudian sel dimatikan perkembangannya dengan memberikan formaldehid 3,7%. Sebanyak 500 μ l. kemudian dibilas dengan menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS). Tahap sebelum dilakukan pewarnaan dilakukan proses penyangga dengan menggunakan *blocking buffer*. kami menggunakan *bovine serume albumin* (BSA) yang dicampur dengan PBS sebagai *blocking buffer*. Penyangga tersebut (PBS-BSA 2%) berfungsi untuk mengikat protein atau sel-sel yang mengganggu agar pada saat pemberian antibodi, antibodi tersebut tidak terikat dengan sel pengganggu. Antibodi dimasukkan pada sumur dan dilakukan inkubasi pada suhu 25°C selama 60 menit. Kemudian dibilas dengan larutan penyangga. Selanjutnya dimasukkan kedalamnya antibodi kedua pada sumur, karena antibodi ini mengkonjugasikan fluorofor maka harus terlindung dari cahaya, karena cahaya berlebihan akan menyebabkan sensitivitas fluorofor berkurang sebelum dianalisis. Senyawa fluoresensi adalah suatu senyawa

yang memiliki electron yang dapat berpindah ke tingkat energi lebih tinggi sehingga akan menyerap panjang gelombang yang berbeda pada keadaan normalnya. Setelah elektron ini kembali ke keadaan normal maka akan sulit untuk tereksitasi kembali.

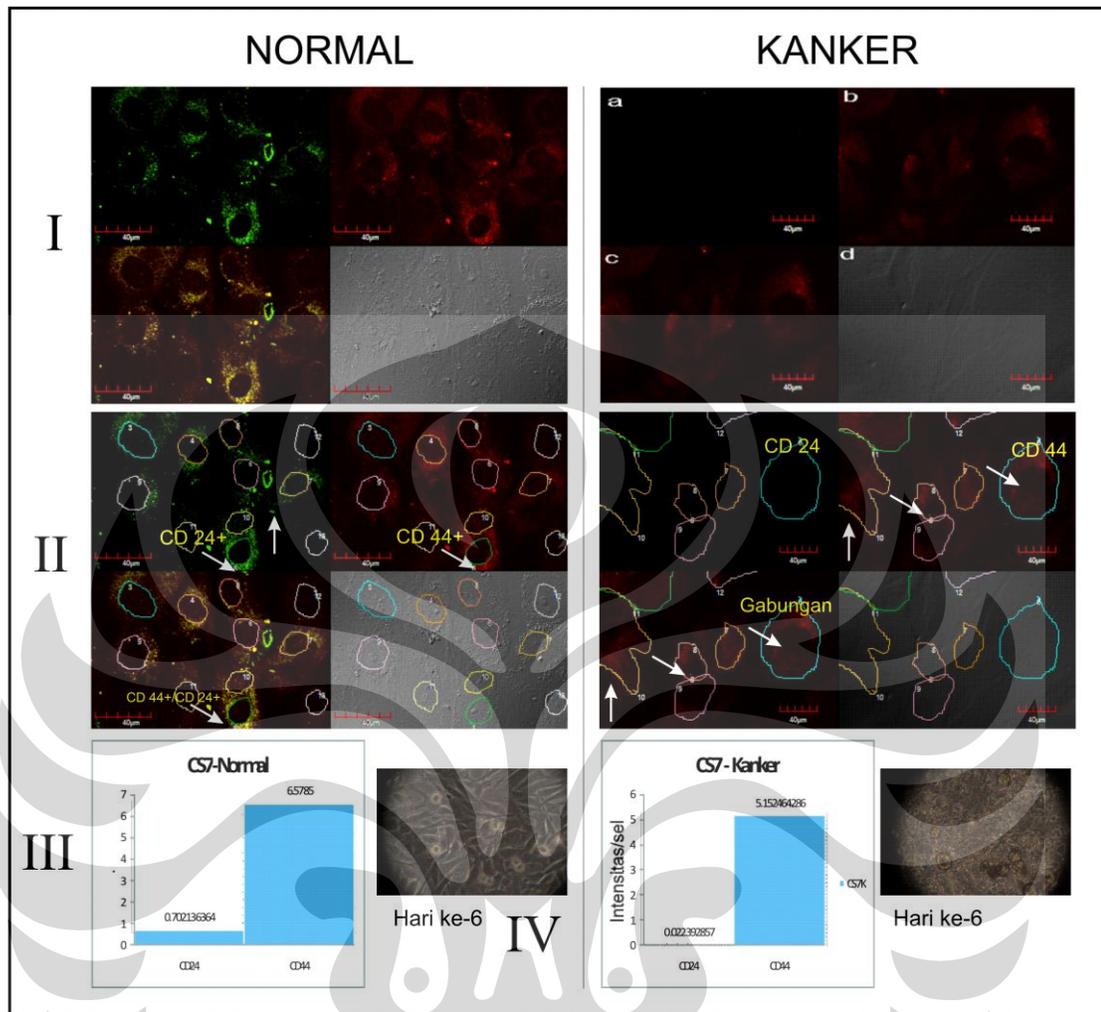
Pada percobaan pertama dibuat 4 sumur (normal negatif, normal positif, kanker negatif, dan kanker positif). Sampel pertama tersebut (CS03-normal melekat) diberikan larutan antibodi pertama dan kedua dengan konsentrasi masing-masing 1/250 dan 1/500. Setelah dilakukan pengamatan pada mikroskop konfokal fluoresensi diperoleh hasil pewarnaan (gambar 4.6.) tampak adanya sedikit fluoresensi pada CD44 dan CD24.



Gambar 4.4 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS3-Normal dengan menggunakan antibodi pertama, rahCD44 dan mahCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, gar-Rhod dan gam-FITC pada konsentrasi 1/500. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40µm. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS3-Normal, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-1.

Pada gambar 4.4 diatas tampak adanya sel-sel fibroblast dari sel yang menunjukkan kemampuannya untuk menjalar pada daerah sekitarnya, sel ini memancarkan fluoresensinya pada bagian tengah sel, sedangkan pada bagian fibroblastnya tidak tampak adanya fluoresensi. Pada hasil pewarnaan tampak CD44 memberikan sinyal positif dan CD24 juga memberikan sinyal positif, yang menunjukkan bahwa sel ini adalah sel payudara normal. Intensitas yang tampak per satuan sel untuk CD44 adalah 104,9273 dan untuk CD24 adalah 0,9807. Bila kita mengamati dari gambar bahwa sampel ini adalah payudara normal, namun bila kita amati dari nilai intensitas bahwa ini menunjukkan bahwa sel kanker payudara. Hal ini dapat terjadi mungkin disebabkan karena kontrol negatif pada sampel kurang bersih sehingga pada penentuan *cut off* terbentuk positif palsu. Dapat dikatakan bahwa sampel ini adalah sampel pendahuluan, maka daripada itu harus dilakukan percobaan kembali pada sampel berikutnya.

Setelah berhasil melakukan pewarnaan pada sampel pertama, maka dilanjutkan dengan pewarnaan sampel berikutnya. Untuk selanjutnya proses pewarnaan dilakukan dengan perlakuan yang sama. Hanya saja untuk memperjelas hasil fluoresensi kami memodifikasi dengan meningkatkan salah satu konsentrasi antibodi yang digunakan yaitu antibodi kedua yang berikatan dengan fluorofor. Maka konsentrasi antibodi pertama adalah 1/250 dan konsentrasi antibodi kedua adalah 1/250. Hasil dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

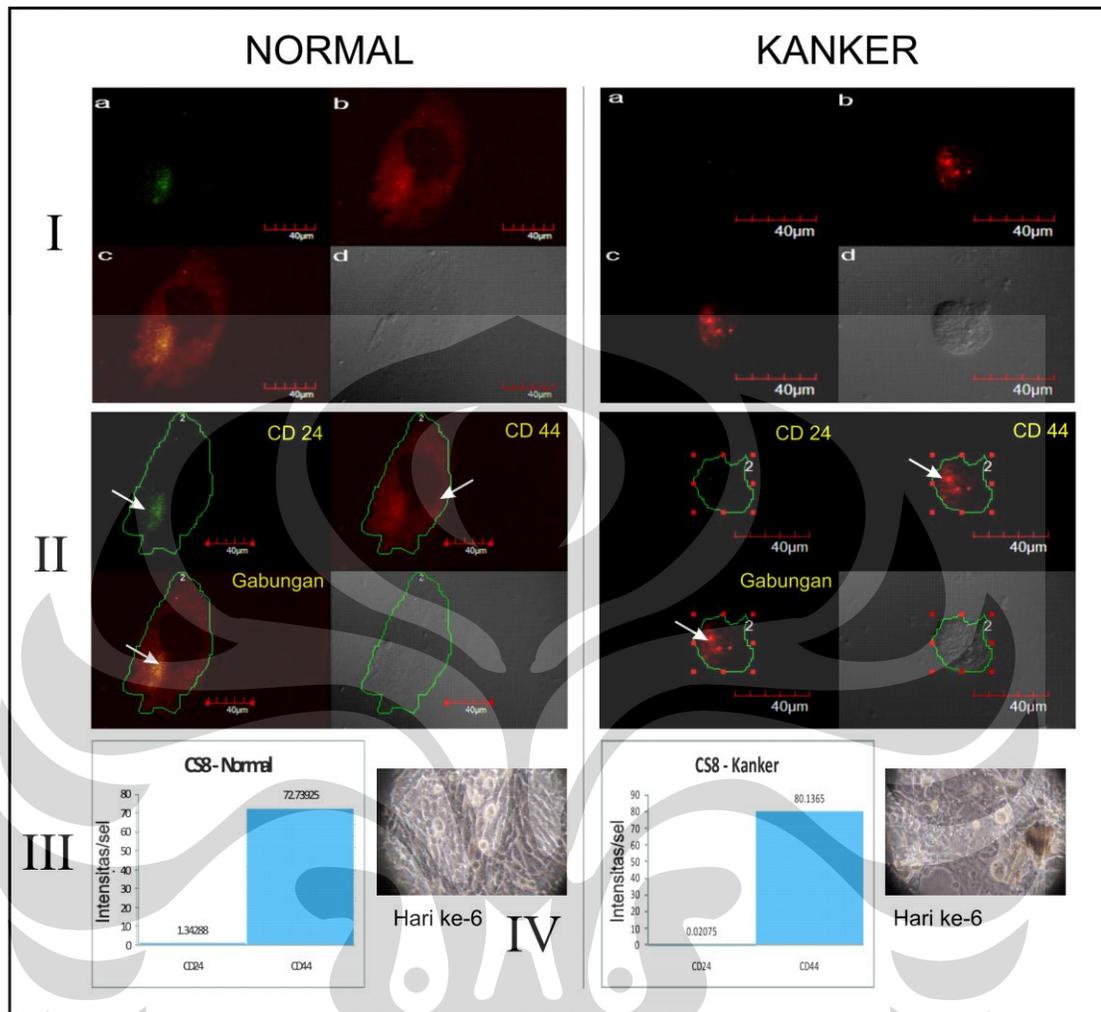


Gambar 4.5 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS7-normal dan kanker dengan menggunakan antibodi pertama, α hCD44 dan α hCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, γ ar-Rhod dan γ am-FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS7-normal dan kanker, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-6. Pada sisi sebelah kiri adalah sel yang dianggap normal dan pada sisi kanan adalah sel kanker payudara.

Pada gambar 4.5 adalah berasal dari sel melekat. Pada sel normal terlihat dengan adanya fibroblast disekitar sel. Pada uji imunofluoresensi terlihat adanya sinyal pada reseptor CD44 dan CD24 yang menunjukkan bahwa sel ini adalah sel normal. Sel normal kali ini adalah sel yang pertumbuhannya sangat cepat dibandingkan dengan sampel lainnya (dapat dibandingkan pada gambar mikroskopis *in vitro*) sehingga tampak sel tersebut berdekatan satu sama lain pada lapang pandang yang sama dengan sampel lain. Intensitas fluoresensi pada sampel ini terlihat berbeda. Nilai intensitas per satuan sel dari CS7-normal untuk CD44 adalah 6,5785 dan CD24 adalah 0,7021.

Pada gambar dibawah ini (Gambar 4.5) pada sampel CS7-kanker, bisa diketahui dengan adanya sinyal reseptor CD44 yang berfluoresensi dan tidak adanya/sedikit sekali sinyal fluoresensi pada reseptor CD24. Terlihat sel saling berdekatan satu sama lainnya, pertumbuhan sel ini sangat cepat pada saat kultur sel dilakukan. Nilai intensitas pada sampel ini untuk CD44 adalah 5,1524 dan untuk CD24 adalah 0,0233. Menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel punca kanker payudara.

Tidak adanya perbedaan nilai intensitas serta fluoresensi antara sel kanker dengan sel normal payudara menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki karakter sel punca kanker payudara. Hal ini dapat disebabkan karena adanya metastasis yang terjadi pada pasien, atau bisa juga pada pengambilan sampel terlalu dekat dengan sel kanker. Seharusnya pada sel normal nilai intensitas antara CD44 dengan CD24 adalah identik sama besarnya.

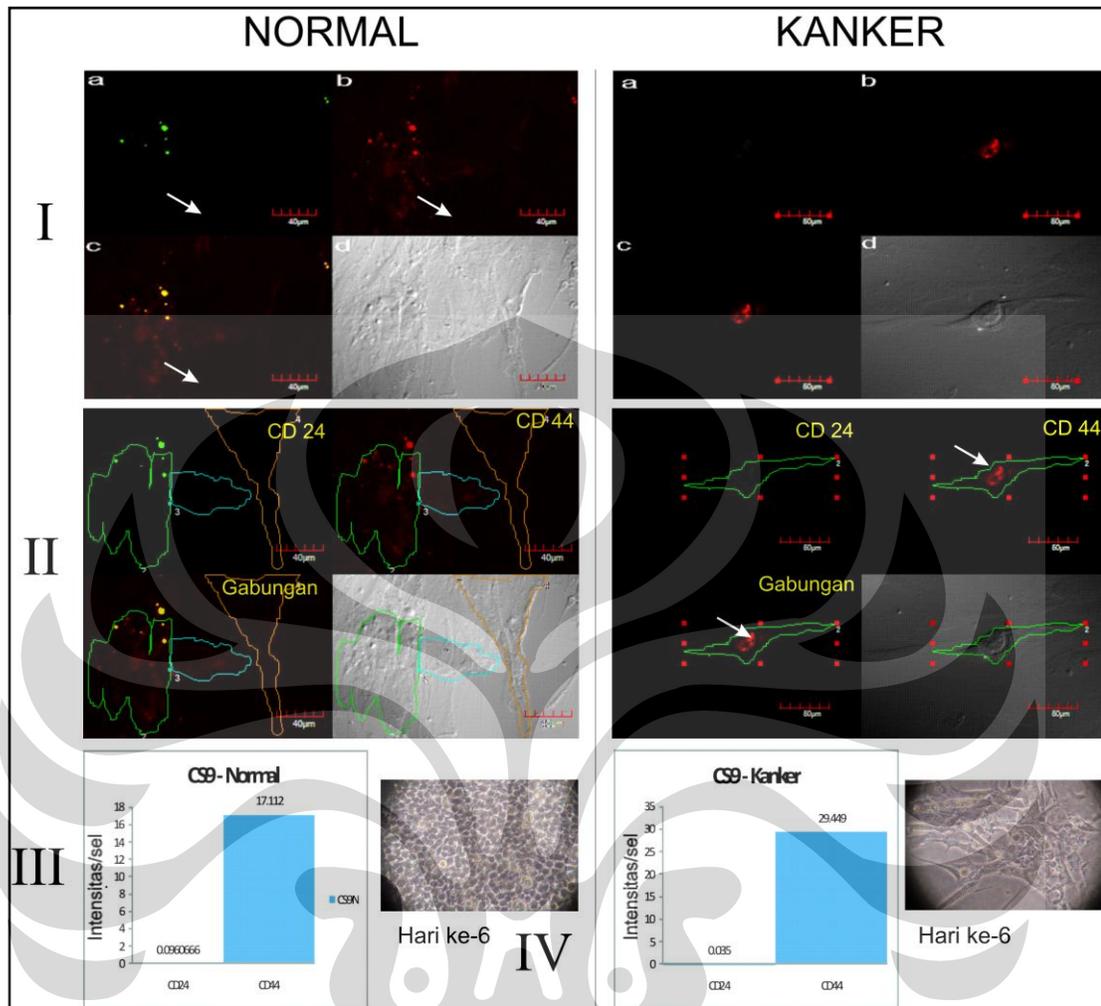


Gambar 4.6 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS8-normal dan kanker dengan menggunakan antibodi pertama, α hCD44 dan α hCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, γ Rhod dan γ FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS8-normal dan kanker, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-6. Pada sisi sebelah kiri adalah sel yang dianggap normal dan pada sisi kanan adalah sel kanker payudara.

Pada gambar 4.6 di atas tampak adanya sinyal pada reseptor CD44 dan tampak pula pada reseptor CD24, yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel normal. Pada sampel kali ini ada perbedaan signifikan antara CD44 dan CD24 pada sel normal mungkin disebabkan pada pengambilan sampel CS8, pada sel normal telah mengalami metastasis dari sel kanker atau bisa disebabkan karena mengambilnya terlalu dekat dengan lokasi kanker payudara. Sampel ini memiliki sifat alamiah yaitu menjalar pada daerah sekitarnya, dapat dilihat tampak adanya fibroblast. Terlihat satu sel saja namun memiliki fibroblast yang besar.

Pada gambar 4.6 diatas tampak adanya sinyal fluoresensi pada reseptor CD44 dan tidak tampak adanya fluoresensi pada reseptor CD24 yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel kanker payudara. Tidak terlihat adanya fibroblast pada sampel ini namun sebenarnya ada tapi tidak tampak jelas pada gambar. sel ini berbentuk bulat.

Pada perbandingan antara sampel CS8 ini nilai rata-rata intensitas fluoresensi CD24 tiap sel pada sel normal adalah 1,3428 dan pada sel kanker adalah 0,0207, sedangkan nilai intensitas rata-rata fluoresensi CD44 tiap sel pada sel normal adalah 72,7392 dan untuk sel kanker adalah 80,1365, yang artinya adalah sel kanker memiliki jumlah CD44 yang lebih banyak daripada sel normalnya. Karena pada sel kanker akan terjadi peningkatan ekspresi pada reseptor CD44 dan penurunan ekspresi CD24. Namun pada sampel ini tidak begitu terlihat adanya perbedaan signifikan antara CD44 sel normal dan CD44 sel kanker.

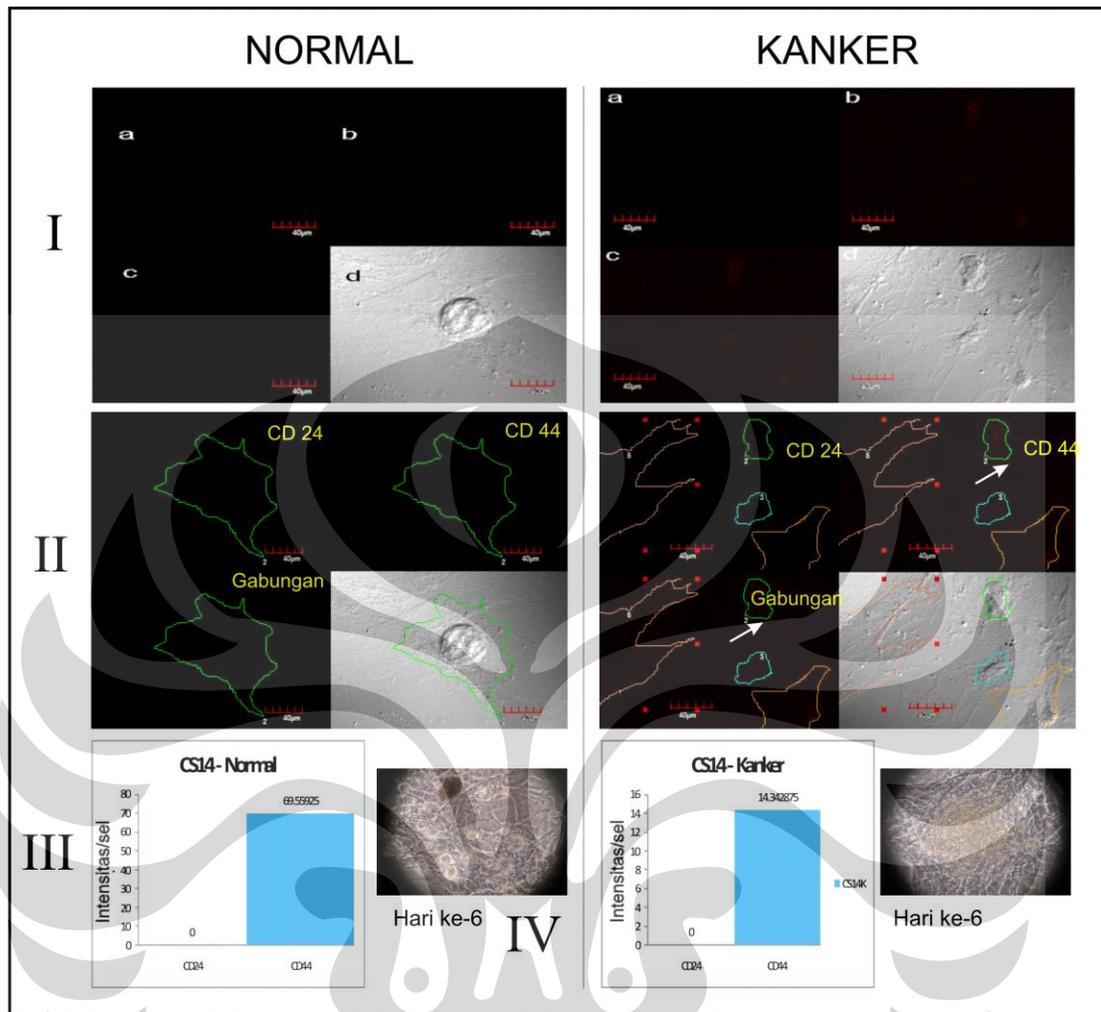


Gambar 4.7 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS9-normal dan kanker dengan menggunakan antibodi pertama, rahCD44 dan mahCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, gar-Rhod dan gam-FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS9-normal dan kanker, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-6. Pada sisi sebelah kiri adalah sel yang dianggap normal dan pada sisi kanan adalah sel kanker payudara.

Pada gambar 4.7 di atas tampak adanya sinyal pada reseptor CD44 dan tampak pula pada reseptor CD24, yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel normal. Namun seharusnya pada sel normal sinyal fluoresensi dari CD44 dan CD24 sama intensitasnya. Pada sampel kali ini berbeda disebabkan mungkin pada pengambilan sampel CS9, pada sel normal telah mengalami metastasis dari sel kanker atau bisa disebabkan karena mengambilnya terlalu dekat dengan lokasi kanker payudara. Sampel ini memiliki sifat alamiah yaitu menjalar pada daerah sekitarnya, dapat dilihat tampak adanya fibroblast. Diperkirakan ada 5 buah sel dalam gambar ini.

Pada gambar 4.7 diatas tampak adanya sinyal fluoresensi pada reseptor CD44 dan tidak tampak adanya fluoresensi pada reseptor CD24 yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel kanker payudara. Dapat dilihat adanya fibroblast pada sampel ini namun hanya sedikit sekali fluoresensinya.

Pada perbandingan antara sampel CS9 ini nilai rata-rata intensitas fluoresensi CD24 tiap sel pada sel normal adalah 0,096 dan pada sel kanker adalah 0,035, sedangkan nilai intensitas rata-rata fluoresensi CD44 tiap sel pada sel normal adalah 17.112 dan untuk sel kanker adalah 29.449, yang artinya adalah sel kanker memiliki jumlah CD44 yang lebih banyak daripada sel normalnya. Karena pada sel kanker akan terjadi peningkatan ekspresi pada reseptor CD44 dan penurunan ekspresi CD24.



Gambar 4.8 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS14-normal dan kanker dengan menggunakan antibodi pertama, α hCD44 dan α hCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, γ ar-Rhod dan γ am-FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS14-normal dan kanker, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-6. Pada sisi sebelah kiri adalah sel yang dianggap normal dan pada sisi kanan adalah sel kanker payudara.

Pada gambar 4.8 di atas tidak tampak adanya sinyal pada reseptor CD44 dan tidak tampak pula pada reseptor CD24, namun memiliki nilai intensitas yang besar pada CD44. Sampel ini memiliki sifat alamiah yaitu menjalar pada daerah sekitarnya, dapat dilihat tampak adanya fibroblast. Diperkirakan hanya ada satu buah sel dalam gambar ini.

Pada gambar 4.8 diatas tampak adanya sinyal fluoresensi pada reseptor CD44 yang sangat kecil dan tidak tampak adanya fluoresensi pada reseptor CD24 yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel kanker payudara. Dapat dilihat adanya fibroblast pada sampel ini namun hanya sedikit sekali fluoresensinya. Diperkirakan ada 4 buah sel dalam gambar ini.

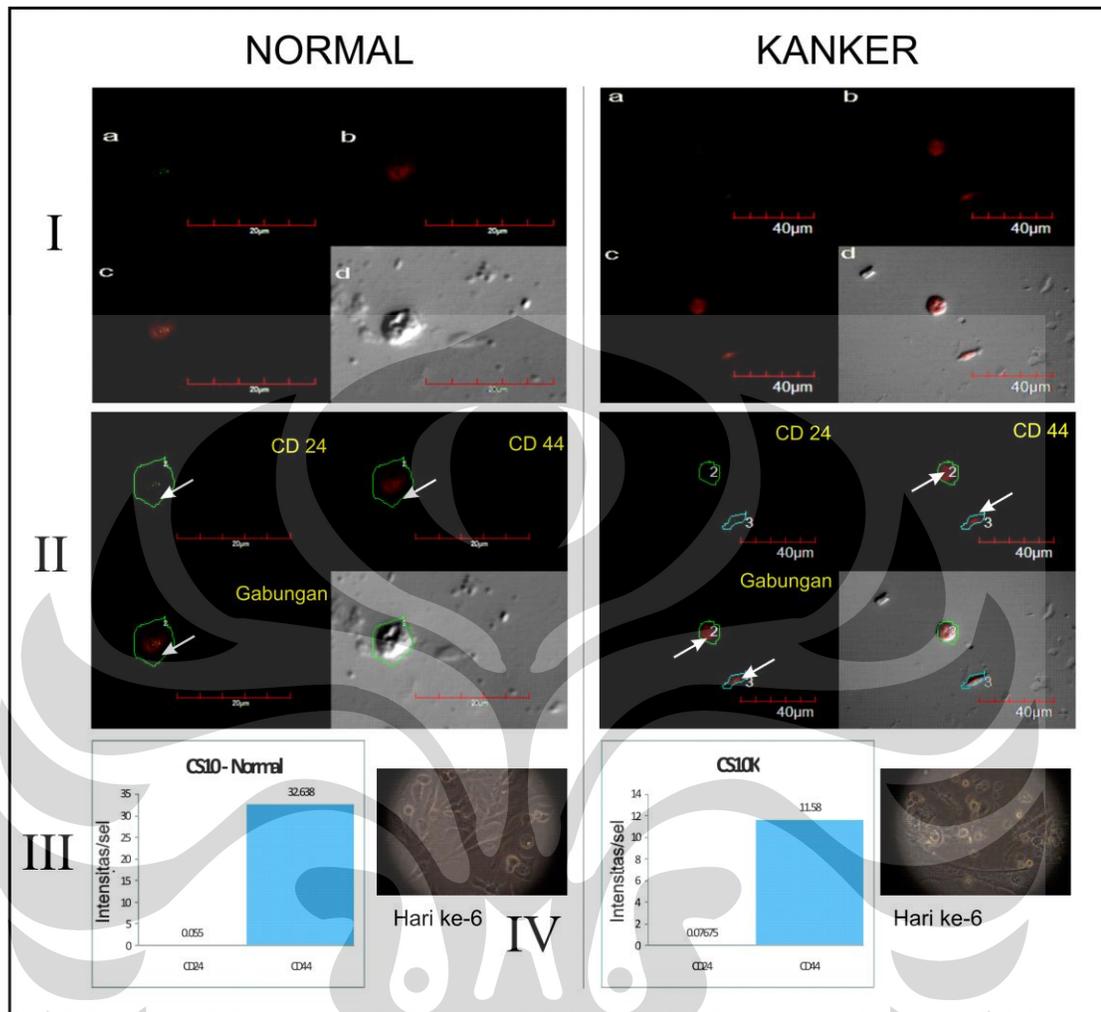
Pada perbandingan antara sampel CS14 ini nilai rata-rata intensitas fluoresensi CD24 tiap sel pada sel normal adalah 0 dan pada sel kanker adalah 0, artinya tidak ada fluoresensi sama sekali, sedangkan nilai intensitas rata-rata fluoresensi CD44 tiap sel pada sel normal adalah 69,559 dan untuk sel kanker adalah 18,3428, yang artinya adalah sel normal memiliki jumlah CD44 yang lebih banyak daripada sel kankernya.

Pada sampel CS10 normal dan kanker dari sel melekat tidak berhasil dilakukan pewarnaan dikarenakan adanya kesalahan teknis pada alat dan *human error*. Maka daripada itu tidak diperoleh gambar dari CS10-normal dan kanker.

4.3.2 Hasil dari sel melayang

Pada sel melayang sampel hasil ekstraksi dilakukan kultur selama 1-2 minggu. Setelah dilakukan kultur maka sampel yang berada pada media cair diambil lalu dimasukkan kedalam plat sumur untuk dilakukan uji imunofluoresensi. Pada sel melayang ini pada *cover slip* telah diberikan larutan *poli-l-lysine*, namun telah dikeringkan terlebih dahulu sebelum dicampur dengan sel, tujuannya untuk merekatkan sel pada *cover slip*. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan antibodi pertama, rahCD44 dan mahCD24 dengan konsentrasi 1/250 dalam PBS-BSA 2%, dan menggunakan antibody kedua, gar-Rhod dan gam-FITC dengan konsentrasi 1/500 dalam PBS-BSA 2%. Hasil gambar dapat dilihat di bawah.

Pada sampel pertama CS3-normal sel melayang, gagal dilakukan pewarnaan dikarenakan tidak muncul gambar pada mikroskop fluoresensi. Maka pada sampel selanjutnya, CS7-normal dan kanker, kami memodifikasi dengan menambah konsentrasi antibodi kedua menjadi 1/250. Hasilnya-pun tidak tampak pada mikroskop fluoresensi. Selanjutnya kami memodifikasi dengan menambah waktu inkubasi antibodi menjadi 120 menit pada sampel CS8-normal dan kanker. namun belum membuahkan hasil. Pada sampel CS10-normal dan kanker, kami melakukannya dengan sangat hati-hati sekali, dengan tetap mengikuti metode pewarnaan sel, hasilnya dapat dilihat pada gambar 4.9 dibawah ini. Pada sampel selanjutnya, CS14-normal dan kanker juga gagal dilakukan.



Gambar 4.9 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS10-normal dan kanker dengan menggunakan antibodi pertama, α hCD44 dan α hCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, γ ar-Rhod dan γ am-FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS10-normal dan kanker, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari ke-6. Pada sisi sebelah kiri adalah sel yang dianggap normal dan pada sisi kanan adalah sel kanker payudara.

Pada gambar 4.9 di atas tampak adanya sinyal pada reseptor CD44 dan tampak pula pada reseptor CD24, namun memiliki nilai intensitas yang lebih kecil dari pada CD44. Sampel ini tidak memiliki sifat menjalar. Maka daripada itu tidak terlihat adanya fibroblast pada gambar. Diperkirakan hanya ada satu buah sel dalam gambar ini.

Pada gambar 4.9 diatas tampak adanya sinyal fluoresensi pada reseptor CD44 dan tidak tampak adanya fluoresensi pada reseptor CD24 yang menunjukkan bahwa sampel ini adalah sel kanker payudara. Pada sampel ini tidak terdapat fibroblast karena ini adalah sel melayang. Diperkirakan ada 2 buah sel dalam gambar ini.

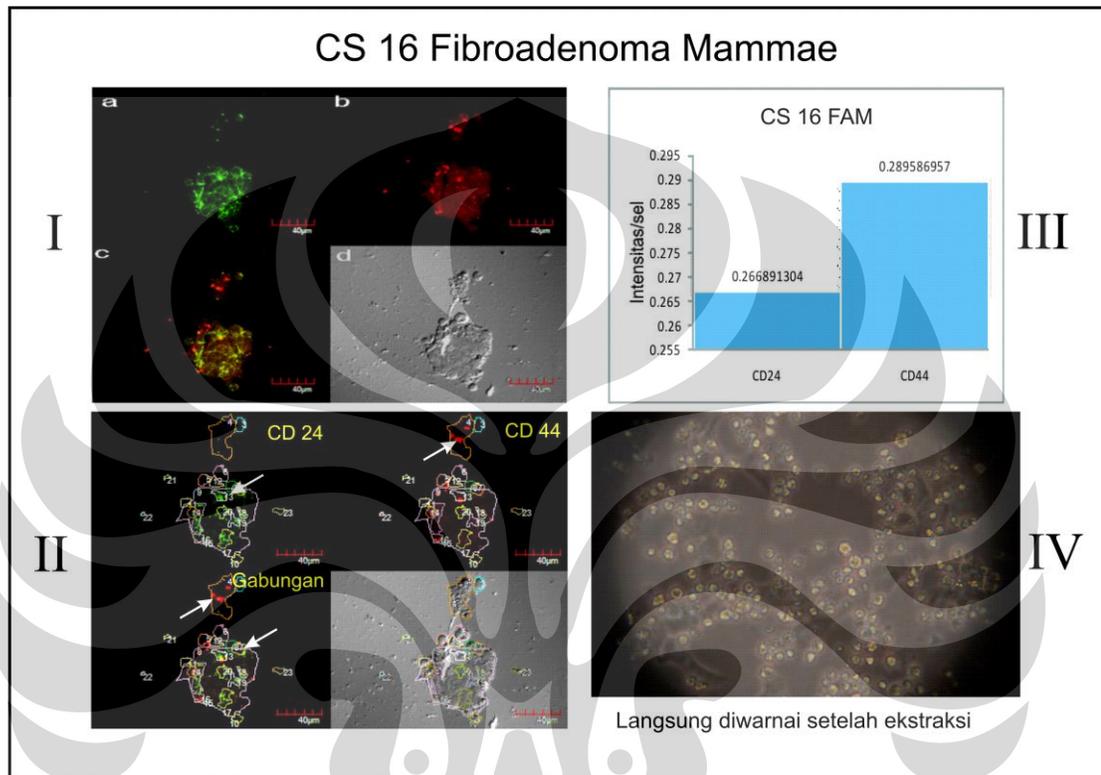
Pada perbandingan antara sampel CS10 melayang ini nilai rata-rata intensitas fluoresensi CD24 tiap sel pada sel normal adalah 0,055 dan pada sel kanker adalah 0,0765, artinya sedikit sekali fluoresensi yang tampak, sedangkan nilai intensitas rata-rata fluoresensi CD44 tiap sel pada sel normal adalah 32,638 dan untuk sel kanker adalah 11,58, yang artinya adalah sel normal memiliki jumlah CD44 yang lebih banyak daripada sel kankernya.

4.3.3 Hasil dari sel melayang yang dimodifikasi

Pada pewarnaan sel melayang dengan menggunakan metode standar (bab III, butir 3.4.4.4) ternyata diperoleh hasil yang kurang memuaskan, yaitu sedikitnya jumlah sel yang dapat diamati dan kebanyakan tidak ada selnya. Sehingga kami melakukan sedikit modifikasi perlakuan namun tidak menyimpang dari prinsip utama, yaitu dengan menggunakan sentrifugasi pada setiap pembilasan. Hipotesis kami mengatakan sel melayang tersebut terbuang selama proses pewarnaan.

Sel kanker hasil ekstraksi pada sampel CS16 *Fibroadenoma Mammae*, dimasukkan kedalam ependorff lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Kemudian masukkan formaldehid 3,7% kedalam tiap-tiap ependorff, lalu sentrifugasi. Kemudian berikan antibodi pertama rahCD44 dan mahCD24 dengan konsentrasi masing-masing 1/250 dalam PBS-BSA 2%, kocok homogen, lalu sentrifugasi, kemudian bilas. selanjutnya diberikan antibodi kedua,

α -Rhod dan α -FITC dengan konsentrasi masing-masing 1/250 dalam PBS-BSA 2%. Cara kerja selengkapnya dapat dilihat pada bab III butir 3.4.4.4.5.



Gambar 4.10 Analisis hasil uji imunofluoresensi hasil ekstraksi sampel CS16-Fibroadenoma Mammae dengan menggunakan antibodi pertama, rahCD44 dan mahCD24 pada konsentrasi 1/250, dan antibodi kedua, α -Rhod dan α -FITC pada konsentrasi 1/250. (I) adalah hasil imunofluoresensi, a: cahaya fluoresensi pada marker CD24, b: cahaya fluoresensi pada marker CD44, c: gabungan dari CD44 dan CD24, d: bentuk sel pada cahaya tampak. Skala garis 40 μ m. (II) adalah fluoresensi sel yang telah diberikan tanda (III) adalah nilai intensitas fluoresensi rata-rata setiap sel pada CS16-Fibroadenoma Mammae, dan (IV) adalah morfologi sel pada saat dilakukan pewarnaan yaitu pada hari sesaat setelah ekstraksi dilakuka.

4.4 Nilai Intensitas Cahaya Rata-rata

Nilai intensitas diperoleh dari alat mikroskop fluoresensi tersebut, nilai tersebut bermanfaat untuk melihat adanya pancaran cahaya fluoresensi pada intensitas cahaya terkecil sekalipun, sehingga tidak jelas terlihat pada mikroskop fluoresensi yang pada sebenarnya ada fluoresensinya namun lemah.

Pada tabel 4,4 dan 4.5 berikut akan ditampilkan intensitas fluoresensi pada setiap pemotretan pada setiap lapang pandang. Nilai intensitas pada lapang pandang tersebut dibagi dengan jumlah sel yang tampak pada lapang pandang.

Tabel 4.4 Nilai Intensitas Cahaya Sel Melekat Pada Uji Immunofluoresensi

No	Nama Sampel	Chanel	Pemotretan				Rata-rata (int/sel)
			1	2	3	4	
1	CS3N	CD24	1,681	1,234	0,724	0,284	0,98075
		CD44	77,048	90,844	96,06	155,717	104,9173
2	CS7N	CD24	0,4803	0,6436	0,9171	0,7674	0,7021
		CD44	6,1912	5,8859	7,2298	7,0071	6,5785
3	CS7K	CD24	0,031	0,003857	0,012714	0,042	0,022393
		CD44	5,503571	4,96	5,57	4,576286	5,152464
4	CS8N	CD24	0	0	0	0	0
		CD44	79,217	70,512	72,804	68,424	72,73925
5	CS8K	CD24	0	0	0	0,083	0,02075
		CD44	79,778	73,224	88,764	78,78	80,1365
6	CS9N	CD24	0,196	0,0414	0,0508	-	0,096067
		CD44	20,3388	15,6314	15,3658	-	17,112
7	CS9K	CD24	0,099	0,002	0,037	0,002	0,035
		CD44	26,436	29,435	27,291	34,634	29,449
8	CS14N	CD24	0	0	0	0	0
		CD44	79,535	70,021	65,284	63,397	69,55925
9	CS14K	CD24	0	0	0	0	0
		CD44	14,5595	14,69125	13,97675	14,144	14,34288

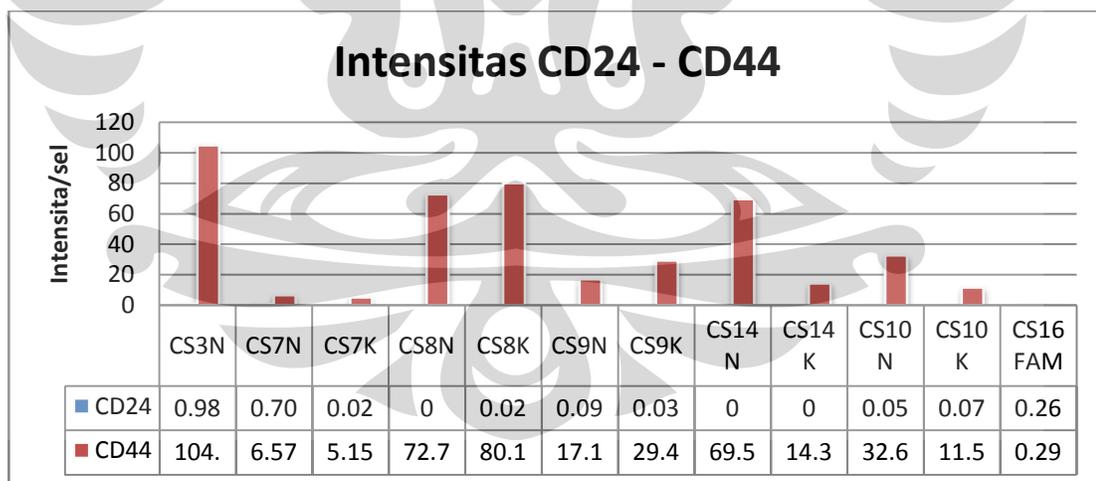
Keterangan: int/sel = intensitas/sel

Tabel 4.5 Nilai Intensitas Cahaya Sel Melayang Pada Uji Imunofluoresensi

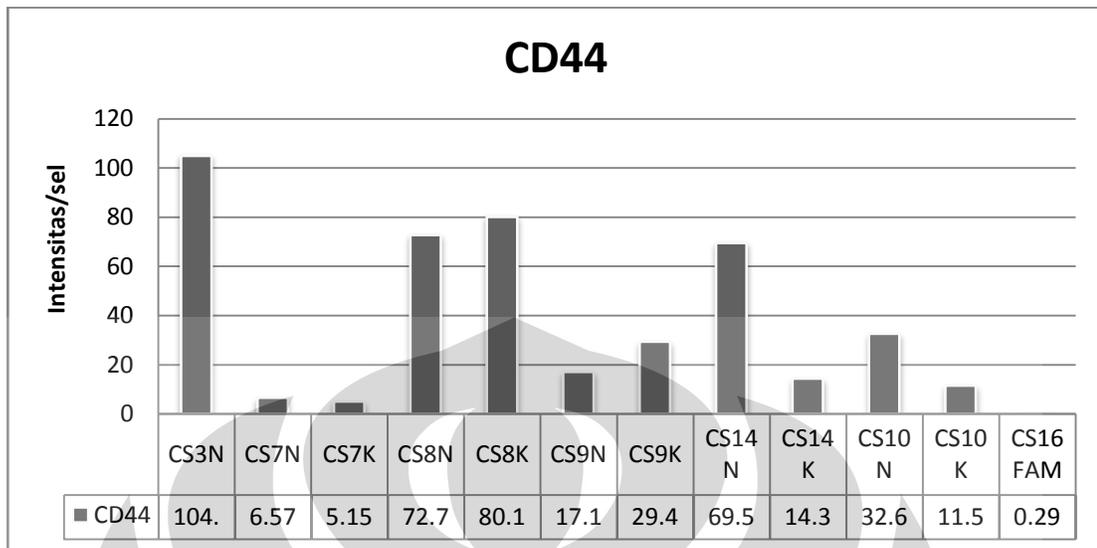
No	Nama Sampel	Chanel	Pemotretan				Rata-rata (int/sel)
			1	2	3	4	
1	CS10N	CD24	0,041	0,025	0,111	0,043	0,055
		CD44	34,128	33,296	28,203	34,925	32,638
2	CS10K	CD24	0,036	0,1285	0,0055	0,137	0,07675
		CD44	13,5945	12,058	10,647	10,0205	11,58
3	CS16K	CD24	0,2057	0,0865	0,2575	0,5177	0,2668
		CD44	0,0934	0,0086	0,5040	0,5520	0,2895

Keterangan: int/sel = intensitas/sel

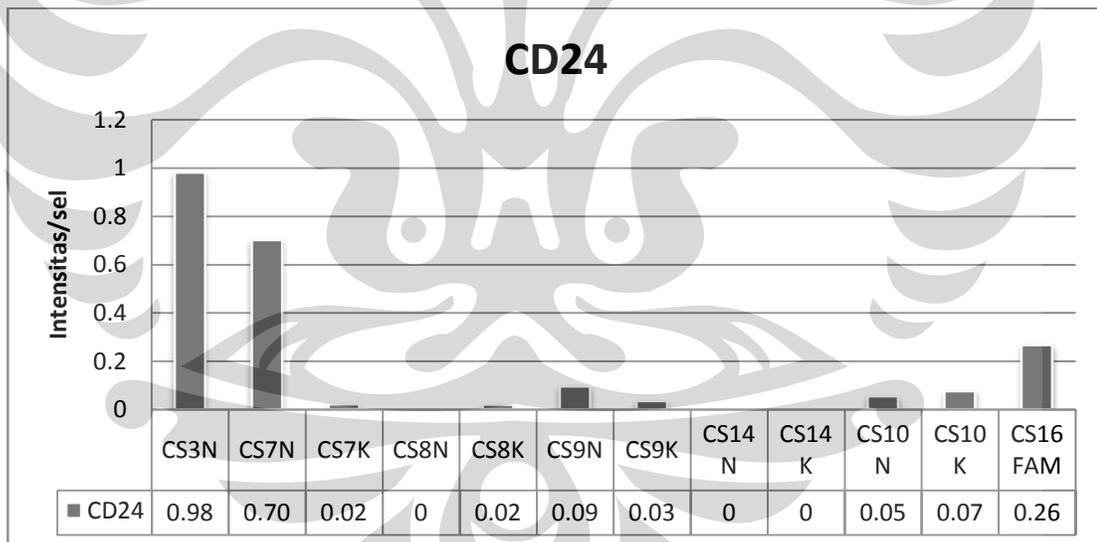
Berikut ini rasio perbandingan nilai rata-rata fluoresensi dari masing-masing sampel yang berhasil dilakukan uji fluoresensi. Terlihat bahwa nilai CD44 cenderung lebih tinggi daripada nilai CD24 yang menunjukkan bahwa hampir semua sampel mengandung karakteristik sel punca kanker payudara namun memiliki nilai yang relatif berbeda-beda. Hal ini dapat dilihat pada gambar dibawah ini (gambar 4.)



Gambar 4.11 Grafik intensitas fluoresensi CD44 dan CD24



Gambar 4.12 Grafik rasio intensitas fluoresensi CD44



Gambar 4.13 Grafik rasio intensitas fluoresensi CD24

Pada perbandingan antara semua nilai CD44 diperoleh nilai bahwa intensitas CD44 pada semua sampel memiliki nilai yang berbeda-beda. Antara sel normal dengan sel kanker tidak terdapat adanya pola yang spesifik. Bahkan untuk CD44 normal memiliki nilai CD44 yang lebih tinggi dari CD44 kanker, seharusnya menurut Al-Hajj dan rekan-rekannya (2003), nilai CD44 untuk sel kanker jauh lebih tinggi daripada untuk sel normal.

Apabila kita bandingkan dengan lamanya waktu kultur sel (gambar 4.3) tampak bahwa apabila sel langsung diuji dengan imunofluoresensi (gambar 4.4) maka nilai intensitas akan lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang lama dikultur dalam plat kultur (gambar 4.5 dan 4.6). kemungkinan terjadinya penurunan nilai CD44, tentunya harus dilakukan penelitian lanjutan untuk menilai tingkat ekspresi CD44 dari waktu ke waktu setelah ekstraksi.

Dari hasil gambar keseluruhan diperoleh bahwa tingkat fluoresensi dari CD44 selalu lebih besar daripada CD24, bahkan dalam sel normal sekalipun. Dalam penelitian yang dilakukan Al-Hajj pada tahun 2003, bahwa seharusnya sel payudara normal memiliki CD44 dan CD24 dalam ekspresi yang normal, sedangkan sel kanker payudara memiliki ekspresi CD44 yang tinggi dan CD24 yang sedikit atau tidak ada. Kami berhipotesis bahwa sel punca kanker payudara telah mencapai tingkat metastasis jauh sehingga hampir semua selnya mengekspresikan reseptor permukaan yang sama. Kami selanjutnya berencana menggunakan sel normal payudara pada pasien yang sehat, namun sulit sekali dilakukan oleh karena hampir tidak ada relawan untuk menyumbangkan selnya.

Kami menggunakan sel tumor jinak untuk menganalisis CD44 dan CD24, karena tumor jinak belum mengekspresikan CD44 secara berlebihan dan CD24 belum berregresi. Kami memperoleh sel tumor jinak tersebut dari Rumah Sakit Kanker Dharmas, yaitu sel fibroadenoma mammae.

Tampak perbedaan yang sangat jelas antara sel kanker ganas dengan sel tumor jinak dari segi ekspresi CD44-nya. Terlihat bahwa perbandingan CD44 pada sel kanker berbeda jauh dengan kontrol yang digunakan. CD44 juga berfungsi sebagai perekat, sehingga bila CD44 telah mencapai ekspresi tertinggi maka metastasis yang

terjadi akibat terbawa oleh sel darah dan sel limfa akan mencapai keseluruhan bagian tubuh. Sehingga akan terbentuk sel kanker yang baru pada daerah sekitarnya maupun pada daerah-daerah yang jauh dari kanker primer tersebut.

Tujuan dari mengetahui proporsi sel punca kanker payudara dengan sel punca payudara normal adalah untuk mempelajari tingkat keefektifan marker terhadap sel punca kanker payudara. Karena reseptor permukaan sel punca kanker payudara sangat spesifik maka sangat efektif untuk penggunaan terapi antibodi di masa mendatang (Dick, 2003). Selain itu dapat digunakan untuk analisis kualitatif untuk mendeteksi sel punca kanker payudara. Tantangan selanjutnya bagi para peneliti adalah bagaimana kita memikirkan untuk memformulasikan antibodi yang sangat potensial tersebut.

Kesalahan yang sering terjadi dan seringkali dianggap remeh adalah pada proses pewarnaan sel dengan menggunakan antibodi seringkali terpapar dengan cahaya lampu sebagai penerangan bagi peneliti. Cahaya akan sangat berpengaruh karena cahaya akan menyebabkan zat fluorofor tereksitasi dan akan memancarkan emisi sehingga menimbulkan positif palsu pada saat pengamatan (Samwogerere et al, 2005).

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Sampel yang dianalisa hampir semuanya (11 sampel dari 12 sampel) memiliki reseptor permukaan CD44 positif dengan CD24 negatif atau ada sedikit,
2. Pada sampel yang sama terdapat perbedaan morfologi sel pada sel melekat dan sel melayang, terlihat adanya fibroblast pada sel melekat dan tidak tampaknya fibroblast pada sel melayang,
3. Dari hasil uji imunofluoresensi antara sel normal dan sel kanker pada pasien yang sama terdapat perbedaan yang signifikan pada intensitas reseptor CD44 dan reseptor CD24, nilai intensitas CD44 lebih tinggi daripada nilai intensitas CD24,
4. Dari hasil uji imunofluoresensi pada semua sampel tidak terdapat perbedaan pada nilai intensitas reseptor CD24, terdapat perbedaan nilai intensitas pada reseptor CD44, namun cenderung lebih tinggi dari CD24,
5. Terdapat perbedaan nilai intensitas CD44 dan CD24 antara sel melayang dengan sel melekat, sel melekat memiliki nilai intensitas yang lebih tinggi daripada sel melayang.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk penyempurnaan penelitian ini. Beberapa saran yang dapat digunakan untuk penelitian lanjutan, antara lain:

1. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan sel payudara normal dari pasien yang sehat agar proporsi fluoresensinya dari CD44 dan CD24 dapat diketahui nilai normalnya,
2. Dengan perlakuan yang sama pada saat pewarnaan sel melayang dan sel melekat ternyata banyak sel-sel melayang yang menghilang karena ikut terbuang saat pembilasan, maka daripada itu pada sel melayang sebaiknya menggunakan metode yang dimodifikasi agar sel-selnya tidak hilang pada saat pembilasan pada proses pewarnaan sel,
3. Marker yang digunakan untuk mengidentifikasi reseptor permukaan sel punca kanker payudara sesuai untuk dipakai analisis reseptor spesifik untuk terapi gen, namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut lagi

DAFTAR REFERENSI

- Aini, N., Setiawan, B., dan Sandra, F. (2008). Karakteristik biologis dan diferensiasi *stem cell*: focus pada *Mesenchymal stem cell*. *Cermin Dunia Kedokteran*, 161, 64-67.
- Alberts, B. et al. (1994). *Biologi molekuler sel edisi ke-2* (Alex Tri Kantjono, Penerjemah). Jakarta: Gramedia Pustaka Utama, 254.
- Al-Hajj, M., et al. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*, 100, 3983-3988.
- Azamris, Arif, W., dan Darwin, E. (2003). Ekspresi CD44 pada jaringan tumor karsinoma payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*, 139, 27-31.
- Baratawidjaja, K. G. dan Rengganis, I. (2009). *Imunologi dasar edisi 8*. Jakarta: Fakultas Kedokteran UI, 656.
- Bellanti, J. A. (1993). *Imunologi III* (A. Samik Wahab, Penerjemah). Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 96-113, 173-179.
- Bolodeoku, J. (n. d.). PCR analysis of CD44 variant in tumor. *Methods in Molecular Medicine*, 16, 189.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2007). *Profil kesehatan Indonesia 2005*. Jakarta: Depkes RI, 52.
- Diananda, R. (2008). *Mengenal seluk-beluk kanker*. Yogyakarta: Katahati, 15-42, 61-102.
- Dick, J. E. (2003). Breast cancer stem cell revealed. *PNAS*, 100, 3547-3549.
- Edwards, R. (1985). Immunoassay, an introduction 1st edition. In Handojo, I (2003). *Pengantar immunoasai dasar*. Surabaya: Airlangga University Press. 48, 52, 57-58.
- Farid, A. (n.d.). Cancer, stem cell, and cancer stem cells. Agustus 31, 2009. [http://www.ahmadfaried.com/admin/dokumen/insight_\(fkup-cancer stem cells\).pdf](http://www.ahmadfaried.com/admin/dokumen/insight_(fkup-cancer_stem_cells).pdf)

- Fillmore, C., dan Kuperwaser, C. (2007). Human breast cancer stem cell marker CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man?. *Breast Cancer Research*, 9, 303-306.
- Ganiswarna, S. G. (Ed.). (1995). *Farmakologi dan terapi*. Jakarta: Gaya Baru, 686-701.
- Gibson, G.G. dan Skett, P. (1991). *Pengantar metabolisme obat (Iis Aisyah B., Penerjemah)*. Jakarta: Universitas Indonesia Press, 197-198.
- Gil, J., et al. (2008). Cancer stem cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J App Genet*, 29, 193-199.
- Goldsby, R. A. (1992). *Kuby immunology* 4th edition. USA: W.H. Freeman and Co., 165-166, 593-597.
- Handojo, I. (2003). *Pengantar imunoasai dasar*. Surabaya: Airlangga University Pres, 45-59.
- Harper, L. J. et al. (2010). Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance. *BioMed Central Cancer*, 10, 166-182.
- Haryana, S.M., dan Soesatyo, M. (1995). Aspek genetic dan imunologik kanker payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*, 99, 52-55.
- Heffner, L. J. dan Schust, D. J. (2006). *At a glance sistem reproduksi edisi-2* (Vidhia Umami, Penerjemah). Jakarta: Erlangga, 84-85.
- Helgason, C. D dan Miller, C. L. (n.d.). *Methods in molecular biology, vol. 29: basic cell culture protocol 3rd edition*. NJ: Humana Press Inc., 1-12.
- Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia. (n.d. a). *Material and methods: culture cells*. Jakarta: IHVCB-UI. 1-6.
- Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia. (n.d. b). *Material and methods: staining methods*. Jakarta: IHVCB-UI. 1-4.
- Macdonald, F., Ford, C. H. J. dan Haites, N. E. (2004). *Molecular biology of cancer*. London: BIOS Scientific Publisher, 12-61, 148-161.
- Madjd, Z., et al. (2009). CD44+ cancer cells express higher level of the anti apoptotic protein Bcl-2 in breast tumors. *Cancer Immunity*, 9, 4-10.

- Marangoni, E. et al. (2007, December). *CD44-targeting inhibits tumor growth and prevents post chemotherapy relapse in human breast cancer xenografts*. Paper presented at International Workshop on Cancer Stem Cells 2nd edition, Milan, Italy. 68.
- Motari, E. et al. (2009). Analysis of recombinant CD24 glycans by MALDI-TOF-MS reveals prevalence of sialyl-T antigen. *American Journal of Biomedical Science*, 1, 1-11.
- Pajic, M. et al. (2007, December). *A genetically engineered mouse model for breast cancer to test the eradication by chemotherapy*. Paper presented at International Workshop on Cancer Stem Cells 2nd edition, Milan, Italy. 31.
- Putra, S. T (Ed). (1997). *Biologi molekuler kedokteran*. Surabaya: Airlangga University Press. 99.
- Reye, T. et al. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 141, 105-111.
- Saputra, V. (2006). Dasar-dasar *stem cell* dan potensi aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*, 153, 21-25.
- Semwogerere, D. dan Weeks, E. R. (2005). Confocal microscopy. *Encyclopedia of biomaterial and biomedical engineering*. Emory University: USA. 1-11.
- Shamblott, M. J. et al. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13726-13731.
- Sudiana, I K. (2008). *Patobiologi molekuler kanker*. Jakarta: Salemba Medika. 27-89.
- Tang, C., Ang, B. T. dan Parvaiz, S. (2007). Cancer stem cell: targeting for anti-cancer therapy. *The FASEB Journal*, 21, 3777-3785.
- The National Academies. (n.d.). *Understanding stem cells*. November 19, 2009. <http://www.national-academies.org>
- Tjindarbumi, D. dan Mangunkusumo, R. (2002). Cancer in Indonesia, present and future. *Japan journal Clinical Oncology*, 32, 17-21.
- Zhang, M. et al. (2007, December). *Therapeutic resistance of breast cancer tumor-initiating cells*. Paper presented at International Workshop on Cancer Stem Cells 2nd edition, Milan, Italy. 20.

Lampiran 1. Sertifikat Lolos Kaji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 196 /PT02.FK/ETIK/2009

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL --- CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

“Analisis pluripotensi dan ekspresi Manganese-Superoxide Dismutase (MnSOD) pada sel punca kanker payudara”.

Peneliti Utama : Dr.rer.physiol dr.Septelia Inawati Wanandi
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Biokimia dan Biologi Molekular FKUI

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, 25 Mei 2009



Chairman
Ketua
Prof. Dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Lampiran 7. Diagram Metode Pewarnaan Sel Modifikasi

