



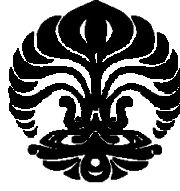
UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGUKURAN LEVEL RNA GEN PENANDA
SEL PUNCA KANKER PAYUDARA DARI KULTUR SEL PRIMER
JARINGAN KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

**AULIA ORNELA
0606070560**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGUKURAN LEVEL RNA GEN PENANDA
SEL PUNCA KANKER PAYUDARA DARI KULTUR SEL PRIMER
JARINGAN KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

**AULIA ORNELA
0606070560**


**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 yang dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Aulia Ornela

NPM : 0606070560

Tanda tangan : 

Tanggal : 14 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Aulia Ornela
NPM : 0606070560
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara

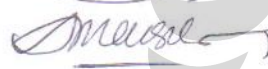
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

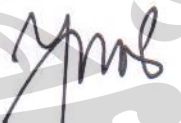
Pembimbing I : dr. Budiman Bela, SpMK.

()

Pembimbing II : Dr. Amarila Malik, Msi

()

Penguji I : Dr. Yahdiana Harahap, MS

()

Penguji II : Dr. Maksun Radji, M.Biomed

()

Penguji III : Sutriyo, MSi

()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 14 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas segala berkat dan karuniaNya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya ingin menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga saya dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Bapak dr. Budiman Bela, SpMK, selaku pembimbing I, yang telah memberikan waktu, tenaga dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing II, yang telah memberikan waktu, pikiran, nasihat dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta memberikan bimbingan ilmu, motivasi, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Ibu Dr. Katrin MS, selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan pikiran yang sangat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Pembina, Ketua Pengurus serta anggota, staf karyawan Laboratorium *Institut of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), khususnya dr. Fera Ibrahim, M.Sc, Ph.D, SpMK selaku *Director for Science* dan dr. Budiman Bela selaku *Vice Director for Science* IHVCB-UI, atas kesempatan yang diberikan

kepada saya untuk melaksanakan penelitian di laboratorium IHVCB-UI.

6. Kedua orang tua (Ayahanda Untung Rohendi dan Ibunda Hendrastati), adik (Iqbal Zakaria) dan Indrawan yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini.
7. Sahabat sahabat saya, Rangga, Rezza, Maulana, Kiki, Rizki Reza, yang telah berjuang bersama saya selama perkuliahan, dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikan 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 pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Aulia Ornela
NPM : 0606070560
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis. Adapun hak cipta karya ilmiah ini dimiliki oleh *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI).

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok
Pada tanggal: 14 Juli 2010
Yang menyatakan



(Aulia Ornela)

ABSTRAK

Nama : Aulia Ornela
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara.

Sel punca kanker adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor. Pada saat ini, dilaporkan bahwa gen SOX2 dan c-Myc berperan penting dalam menginduksi sel punca progenitor dari sel fibroblast manusia dewasa. Oleh karena itu, kami berkeinginan untuk meneliti level RNA gen SOX2 dan c-Myc sel yang diperoleh dari jaringan kanker payudara dengan populasi sel punca kanker menggunakan metode *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Metode RT-PCR merupakan metode terpilih untuk mendeteksi jumlah mRNA dalam jumlah kecil namun metode ini memerlukan normalisasi agar pengukuran menjadi lebih akurat. Kami menormalisasi level RNA dengan menggunakan *housekeeping gene* PUM1 sebagai kontrol dalam. Hasilnya menunjukkan bahwa ekspresi gen SOX2 dan c-Myc meningkat sebanyak 1,47% -13,11% dan 27,37%- 37,77% setelah dinormalisasi yang mengindikasikan bahwa ekspresi PUM dan c-Myc meningkat pada sel punca kanker payudara.

Kata kunci : c-Myc, normalisasi, PUM1, RT-PCR, sel punca kanker, SOX2
xiv+87 halaman: 30 gambar; 6 tabel; 8 lampiran
Daftar acuan : 68 (1902-2010)

ABSTRACT

Name : Aulia Ornela
Program Study : Pharmacy
Title : Measurement of RNA Level in Genes that Encode The Breast Cancer Stem Cells from Primary Culture Cells in Breast Cancer Tissues.

Cancer stem cells are a small subpopulation of cancer cells which has stemness characteristic like normal stem cells, some of those characteristics are self-renewal and high rate of survival that can cause tumor recurrence and metastasis. Recently, scientists reported that SOX2 and c-Myc genes are involved in induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblast. Therefore, we intended to examine RNA level of SOX2 and c-Myc in cells that taken from breast cancer tissues with stem cells population using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Given the ability to detect very low abundance mRNA, reverse transcription-polymerase chain reaction is a complex technique that requires normalization to become more accurate. We normalize RNA level using *housekeeping gene* PUM1 as internal control. Our result show that expression of SOX2 and c-Myc increase by 1,47% -13,11% and 27,37%- 37,77% after normalization whereas indicate SOX2 and c-Myc are rising up in breast cancer stem cells.

Keywords : c-Myc, cancer stem cells, SOX2, PUM1, normalization, RT-PCR
xiv+87 pages : 30 pictures; 6 tables; 8 appendices
Bibliography : 68 (1902-2008)

DAFTAR ISI

Halaman

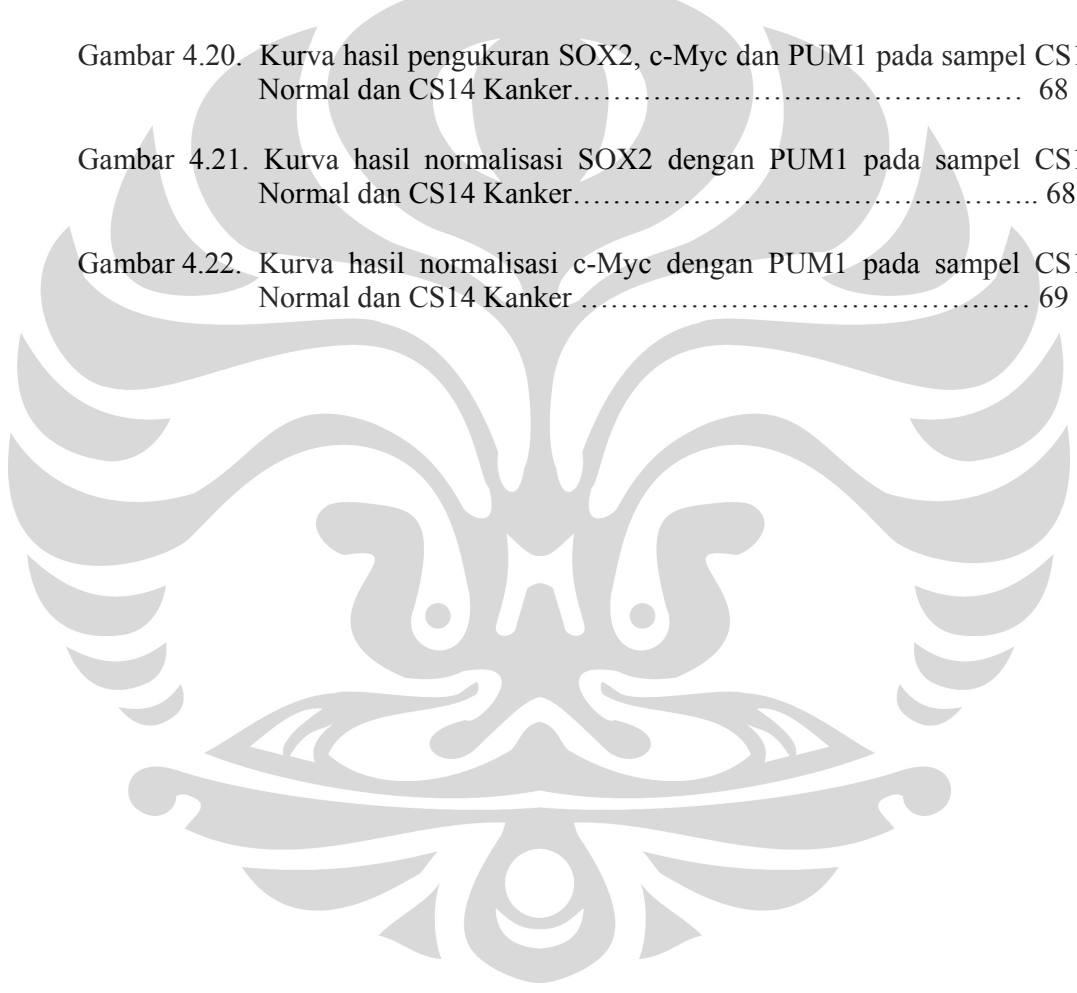
| | |
|--|-------------|
| HALAMAN JUDUL | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | iii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iv |
| KATA PENGANTAR | v |
| LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH | vii |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR ISI | x |
| DAFTAR GAMBAR | xi |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| | |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Tujuan Penelitian | 3 |
| | |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 4 |
| 2.1. Kanker Payudara | 4 |
| 2.2. Sel Punca Kanker..... | 6 |
| 2.3. Gen SOX2 | 8 |
| 2.4. Gen c-Myc | 10 |
| 2.5. Ekstraksi RNA | 11 |
| 2.6. Normalisasi mRNA..... | 12 |
| 2.7. complementary DNA | 15 |
| 2.8. <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR)..... | 16 |
| 2.8.1. Optimasi PCR..... | 19 |
| 2.8.1.1. Konsentrasi Ion Magnesium..... | 19 |
| 2.8.1.2. Konsentrasi Ion Lain | 19 |
| 2.8.1.3. Konsentrasi Enzim..... | 20 |
| 2.8.1.4. Konsentrasi dNTP | 20 |
| 2.8.1.5. Denaturasi..... | 20 |
| 2.8.1.6. Perlekatan (<i>Annealing</i>)..... | 21 |
| 2.8.1.7. Pemanjangan (<i>Extention</i>)..... | 21 |
| 2.8.1.8. Jumlah Siklus..... | 21 |
| 2.8.1.9. Primer..... | 21 |
| 2.8.1.10. Kualitas RNA Cetakan..... | 22 |
| 2.8.1.11. PCR <i>Enhancer</i> | 22 |
| 2.8.1.12. Kontaminasi..... | 22 |
| 2.9. Elektroforesis Gel Akrilamid..... | 23 |
| | |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 25 |
| 3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian..... | 25 |
| 3.2. Perijinan Komisi Etik | 25 |
| 3.3. Bahan | 25 |
| 3.4. Alat | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5. Cara Kerja..... | 26 |
| 3.5.1. Pembuatan Medium..... | 26 |
| 3.5.2. Penggantian Medium..... | 26 |
| 3.5.3. Ekstraksi Total RNA..... | 27 |
| 3.5.4. Analisis Kemurnian Total RNA..... | 28 |
| 3.5.5. Persiapan RT-PCR..... | 29 |
| 3.5.6. Proses RT-PCR..... | 30 |
| 3.5.7. Analisis Amplikon dengan Gel Akrilamid..... | 31 |
| 3.5.8. Pengukuran Intensitas..... | 32 |
| 3.5.9. Uji Linearitas..... | 32 |
| 3.5.10. Pengukuran Level RNA SOX2, c-Myc, PUM1 pada CS14 | 33 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 34 |
| 4.1. Pembuatan Medium..... | 34 |
| 4.2. Penggantian Medium | 34 |
| 4.3. Ekstraksi Total RNA dan Analisis Kemurnian Total RNA | 34 |
| 4.4. Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop..... | 37 |
| 4.5. Optimasi RT-PCR | 38 |
| 4.6. Uji Linearitas RT-PCR..... | 41 |
| 4.7. Analisis Level Ekspresi Gen SOX2 dan c-Myc | 42 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 45 |
| 5.1 Kesimpulan | 45 |
| 5.2 Saran | 45 |
| DAFTAR ACUAN | 46 |

DAFTAR GAMBAR

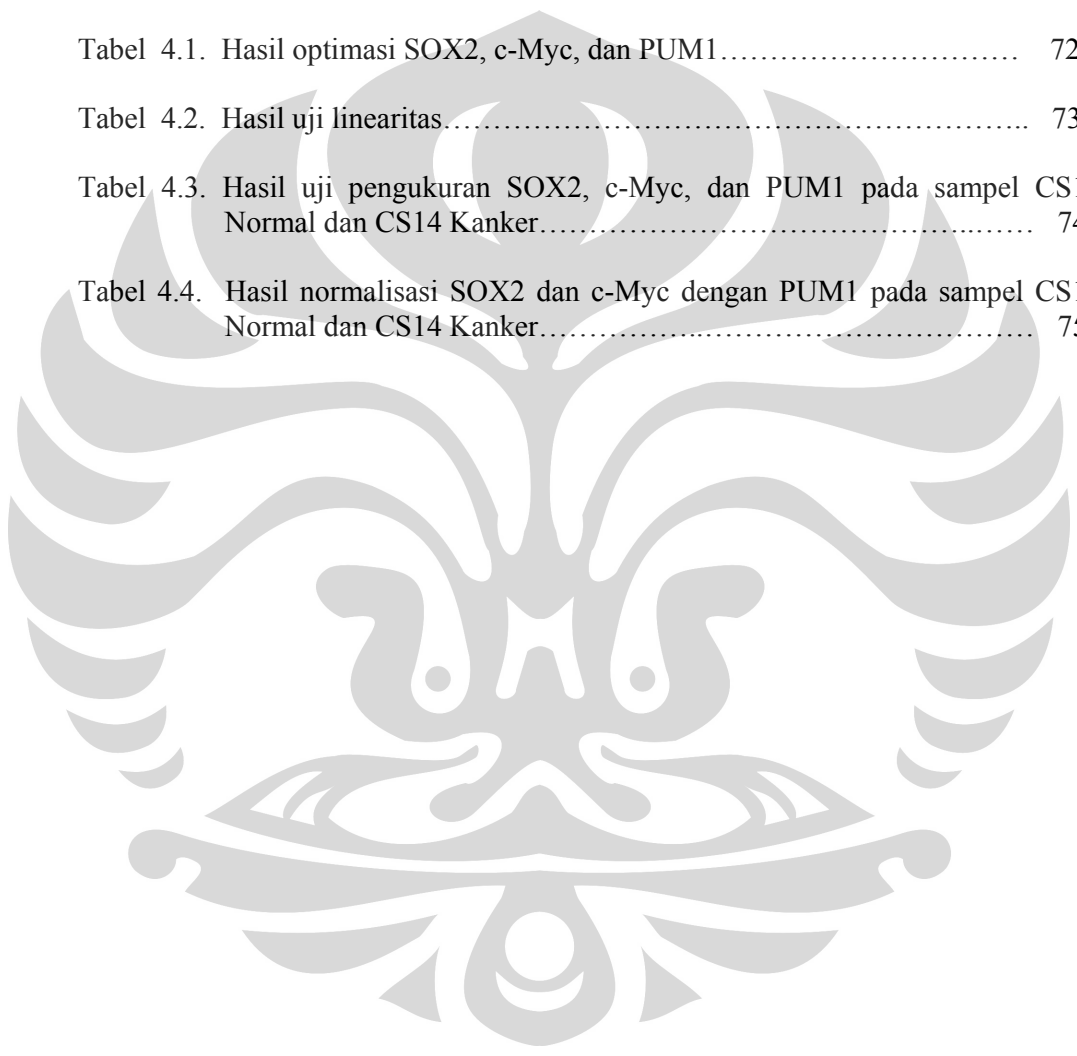
| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1. Anatomi payudara normal manusia..... | 4 |
| Gambar 2.2. Hipotesis sel punca kanker..... | 7 |
| Gambar 2.3. Letak gen SOX2 pada kromosom manusia | 8 |
| Gambar 2.4. Letak gen c-Myc pada kromosom manusia..... | 11 |
| Gambar 2.5. Letak gen PUM1 pada kromosom manusia | 15 |
| Gambar 2.6. Kurva proses PCR | 17 |
| Gambar 2.7. Proses RT-PCR | 18 |
| Gambar 2.9. Proses PCR | 53 |
| Gambar 4.1. Pertumbuhan sampel sel normal dan sel kanker..... | 54 |
| Gambar 4.2. Mikroskop | 55 |
| Gambar 4.3. Sentrifus..... | 55 |
| Gambar 4.4. Mikrosentrifus..... | 56 |
| Gambar 4.5. Spektrofotometer NanoDrop | 56 |
| Gambar 4.6. Alat cetakan dan elektroforesis gel akrilamid..... | 57 |
| Gambar 4.7. Alat PCR..... | 57 |
| Gambar 4.8. UV transiluminator..... | 58 |
| Gambar 4.9. Penanda 100 bp..... | 59 |
| Gambar 4.10. Penanda 2 Log..... | 59 |
| Gambar 4.11. Posisi desain primer SOX2..... | 60 |
| Gambar 4.12. Posisi desain primer c-Myc | 60 |
| Gambar 4.13. Posisi desain primer PUM1 | 61 |

| | |
|---|----|
| Gambar 4.14. Hasil optimasi PCR untuk SOX2 dan c-Myc | 62 |
| Gambar 4.15. Hasil optimasi PCR untuk PUM1 | 63 |
| Gambar 4.16. Hasil uji linearitas SOX2 | 64 |
| Gambar 4.17. Hasil uji linearitas c-Myc | 65 |
| Gambar 4.18. Hasil uji linearitas PUM1 | 66 |
| Gambar 4.19. Hasil pengukuran SOX2, c-Myc dan PUM pada sampel CS14 Normal dan CS 14 Kanker..... | 67 |
| Gambar 4.20. Kurva hasil pengukuran SOX2, c-Myc dan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker..... | 68 |
| Gambar 4.21. Kurva hasil normalisasi SOX2 dengan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker..... | 68 |
| Gambar 4.22. Kurva hasil normalisasi c-Myc dengan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker | 69 |



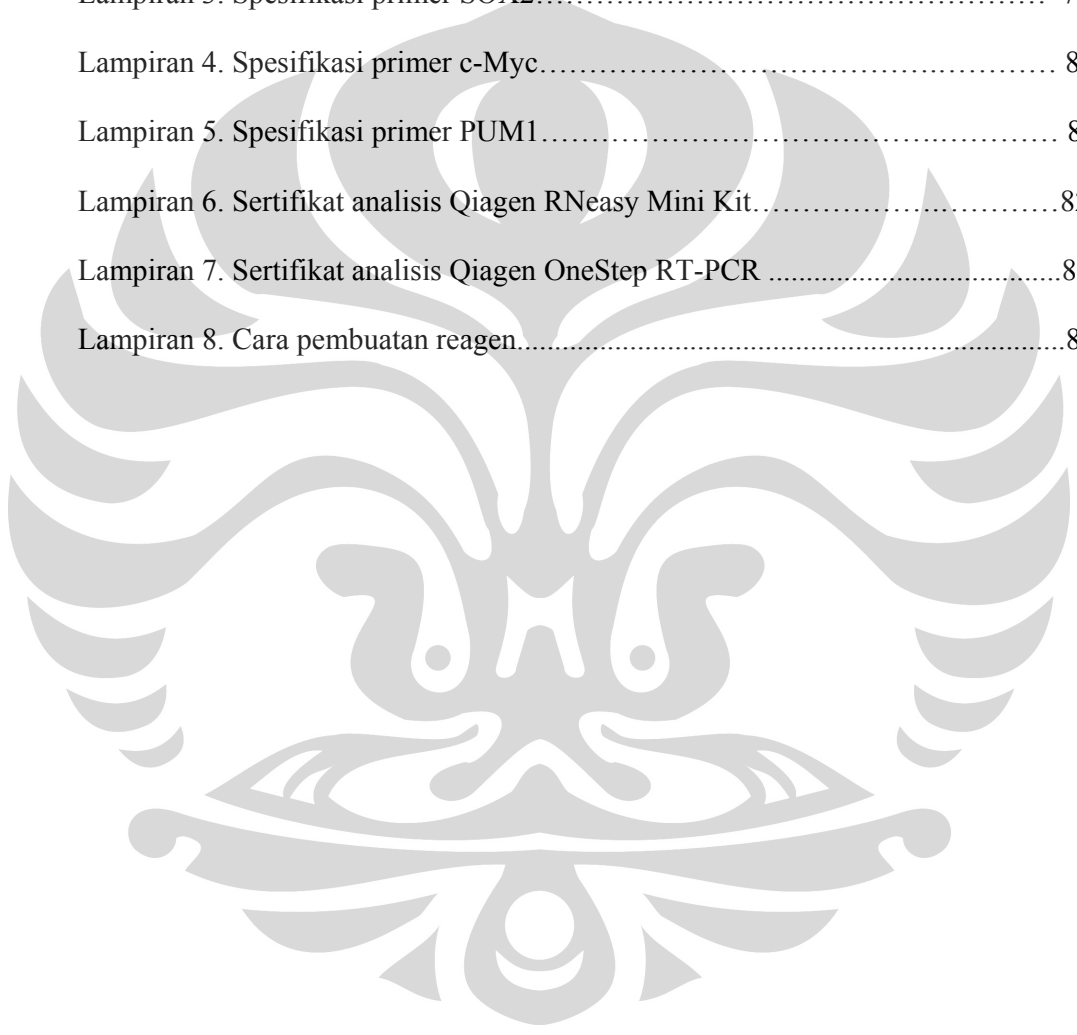
DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 3.1. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan dalam RT-PCR | 70 |
| Tabel 3.2. Urutan basa primer untuk RT-PCR..... | 71 |
| Tabel 4.1. Hasil optimasi SOX2, c-Myc, dan PUM1..... | 72 |
| Tabel 4.2. Hasil uji linearitas..... | 73 |
| Tabel 4.3. Hasil uji pengukuran SOX2, c-Myc, dan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker..... | 74 |
| Tabel 4.4. Hasil normalisasi SOX2 dan c-Myc dengan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker..... | 75 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| Lampiran 1. Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>)..... | 76 |
| Lampiran 2. Surat perijinan komisi etik | 78 |
| Lampiran 3. Spesifikasi primer SOX2..... | 79 |
| Lampiran 4. Spesifikasi primer c-Myc..... | 80 |
| Lampiran 5. Spesifikasi primer PUM1..... | 81 |
| Lampiran 6. Sertifikat analisis Qiagen RNeasy Mini Kit..... | 82 |
| Lampiran 7. Sertifikat analisis Qiagen OneStep RT-PCR | 83 |
| Lampiran 8. Cara pembuatan reagen..... | 84 |



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Telah banyak penelitian yang dilakukan dalam rangka mengetahui peranan sel punca dalam tubuh manusia dan kegunaannya dalam dunia kedokteran dan pengobatan. Studi mengenai sel punca ini dimulai ketika John Beard (1902), embriologis asal Skotlandia, mengemukakan teori yang dikenal sebagai *germ cell theory of cancer* setelah dalam penelitian yang dilakukannya menemukan kemiripan sifat sel tumor dengan sel embrionik. *Stem cell* atau sel punca adalah sel tunggal yang dapat bereplikasi untuk memperbanyak diri atau berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Pada banyak jaringan, sel ini berperan sebagai sistem perbaikan internal yaitu dengan membelah dan menggantikan sel yang rusak atau mati selama organisme tersebut masih hidup (Siminovith, McCulloch, & Till, 1963). Sifat *self-renewal* yang dimiliki oleh sel punca ini sangat penting terutama pada jaringan yang aktif membelah seperti sel sumsum tulang belakang.

Sel punca kanker atau *cancer stem cell* (CSC) adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor. Karakter *self renewal* yang dimiliki oleh sel punca kanker berbeda pada sel punca normal dimana sel punca normal akan berhenti membelah jika jumlah sel yang diinginkan sudah tercapai sedangkan pada sel punca kanker, sistem ini mengalami disregulasi dalam menghambat pembelahannya sehingga jumlah sel dalam jaringan kanker akan meningkat. Oleh karena itu, sel punca kanker disebut memiliki *indefinite proliferative potential* (Mei Zhang dan Rosen, 2006). Sifat *self renewal* pada sel punca kanker ini juga diduga memiliki peranan dalam sifat sel punca yang lain yaitu resistensinya terhadap obat. Peranan ini karena dalam salah satu mekanisme sifat *self renewal* adalah ketahanan sel dalam menghadapi xenobiotik. Salah satu agen yang terlibat dalam mekanisme menangkal xenobiotik ini adalah *ATP-binding cassette transporter* yang terekspresi dalam level tinggi dalam sel punca kanker pada kanker payudara (Zhou et al., 2001). Oleh karena itu, diduga sel punca kanker juga memiliki sifat resistensi terhadap kemoterapi.

Kanker payudara adalah jenis kanker yang frekuensi kejadiannya tinggi dan penyebab kematian pertama pada kanker wanita (Aditama, 2010). Berdasarkan data Globocan, *International Agency for Research on Cancer* (IARC) tahun 2002, kanker payudara menempati urutan pertama dari seluruh kanker pada perempuan (*insidence rate* 38 per 100 000 perempuan). Insidens kanker payudara di Indonesia belum diketahui secara pasti karena belum ada registrasi kanker berbasis populasi. Tetapi berdasarkan Globocan, IARC 2002, didapatkan estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100 000 perempuan (Ferlay, 2002). Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, angka kejadian kanker payudara di Indonesia sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2010).

Keberadaan sel punca kanker payudara manusia yang heterogen telah dibuktikan berdasarkan identifikasi beberapa penanda permukaan sel, yaitu CD44⁺, CD24⁻, ESA⁺ dan CD133⁺ pada populasi sel punca kanker payudara yang berbeda (Fillmore dan Kuperwasser, 2007). Heterogenitas sel kanker payudara dapat menyebabkan respon terapi yang tidak sempurna. Kebijakan klinis terapi konvensional untuk kanker pada umumnya berdasarkan pada anggapan bahwa semua sel kanker mempunyai potensi keganasan yang sama, tanpa mempertimbangkan adanya sel punca kanker. Baru sejak 7 tahun yang lalu diketahui keberadaan sel kanker payudara yang bersifat tumorigenik dan diidentifikasi sebagai sel punca kanker (Al Hajj et al., 2003). Identifikasi sel punca kanker payudara merupakan langkah strategis dalam meningkatkan keberhasilan terapi kanker yang selama ini hanya dinilai dari pengecilan massa tumor tanpa usaha eliminasi sel punca kanker (Tang, Beng, dan Shazib, 2007, Song dan Miele, 2007).

Ekspresi gen SOX2, Oct3/4, Klf4 dan c-Myc diketahui dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel yang telah terdiferensiasi seperti fibroblast, yang disebut juga dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Informasi mengenai tingkat ekspresi maupun polimorfisme keempat gen tersebut pada sel kanker payudara menarik untuk diteliti, khususnya dalam rangka menentukan peranannya pada pembentukan sel punca kanker payudara.

Pada penelitian kali ini hanya akan melihat ekspresi gen SOX2 dan c-Myc karena peranan penting dari kedua gen tersebut dalam menentukan pluripotensi

dan pertumbuhan sel. Pengukuran level ekspresi gen SOX2 dan c-Myc dilakukan dengan metode molekular menggunakan *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan menggunakan cetakan total RNA dan primer spesifik untuk gen target yaitu SOX2 dan c-Myc dan *housekeeping genes* PUM1. Pengukuran level ekspresi dilakukan dengan mengukur intensitas pita gen target yang dielektroforesis dalam gel poliakrilamid 8% dengan menggunakan densitometry dan hasil pengukuran dinormalisasi dengan intensitas pita *housekeeping genes* PUM1 yang juga dielektroforesis dalam gel poliakrilamid 8%.

1.2. Tujuan Penelitian

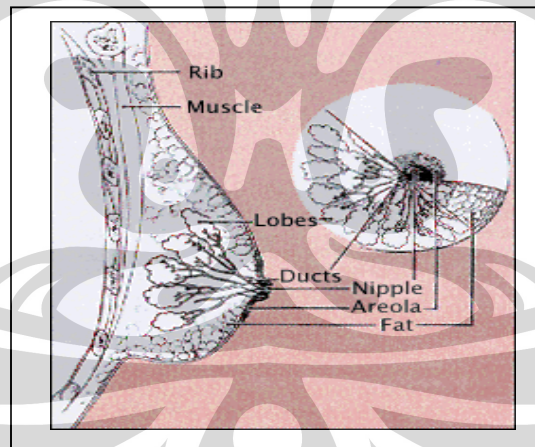
1. Memperoleh kondisi optimum RT-PCR untuk gen target yaitu SOX2 dan c-Myc dan *housekeeping genes* yaitu PUM1.
2. Menganalisis ekspresi mRNA gen SOX2 dan gen c-Myc pada sel kanker payudara dengan populasi sel punca kanker dibandingkan dengan sel payudara normal untuk menilai proporsi sel punca kanker.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Payudara

Payudara terdiri dari kelenjar penghasil susu yang disebut lobulus, dikelilingi oleh lapisan lemak dan tidak berisi jaringan otot. Payudara didukung dan melekat pada dinding dada oleh ligamen yang disebut *Cooper's ligament*. Jaringan payudara melekat pada otot dada yang disebut *pectoralis mayor*. Setiap payudara berisi 15-20 lobus yang diselubungi dan didukung oleh jaringan ikat atau lemak. Setiap lobus mengandung lobulus yang berfungsi sebagai kantung penghasil susu. Hasil produksi susu kemudian dikirimkan ke puting oleh saluran yang terhubung dengan lobulus. Puting terletak di kulit payudara yang berfungsi untuk mengeluarkan susu yang dihasilkan oleh lobulus. Daerah berpigmen yang mengelilingi puting disebut areola (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Untuk gambar lebih jelas mengenai anatomi payudara normal manusia dapat dilihat pada gambar 2.1.



[Sumber : Centers for Disease Control and Prevention, 2001]

Gambar 2.1. Anatomi Payudara Normal Manusia

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya. Jika penyebarannya tidak terkontrol, maka dapat berujung pada kematian. Penyebab kanker dapat dikarenakan oleh 2 faktor yaitu faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal dapat berupa rokok, bahan kimia, radiasi dan organisme penginfeksi

sedangkan faktor internal meliputi mutasi gen (misalnya gen BRCA1 dan BRCA2), hormon, kondisi imun, dan metabolisme (American Cancer Society, 2007).

Kanker payudara adalah pertumbuhan sel atau jaringan payudara yang tidak terkontrol dengan frekuensi kejadian yang tinggi. Kanker payudara sering ditemukan di seluruh dunia dengan insidens relatif tinggi, yaitu 31% dari seluruh kanker yang dialami oleh wanita (Pazdur et al., 2008). *American Cancer Society* (2007) memperkirakan 460.000 pasien penderita kanker payudara meninggal antara 1990-2000. Kejadian kanker payudara di Indonesia menempati peringkat pertama berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007 yaitu angka kejadian untuk kanker payudara sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2010) dengan estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100 000 perempuan (Ferlay, 2002).

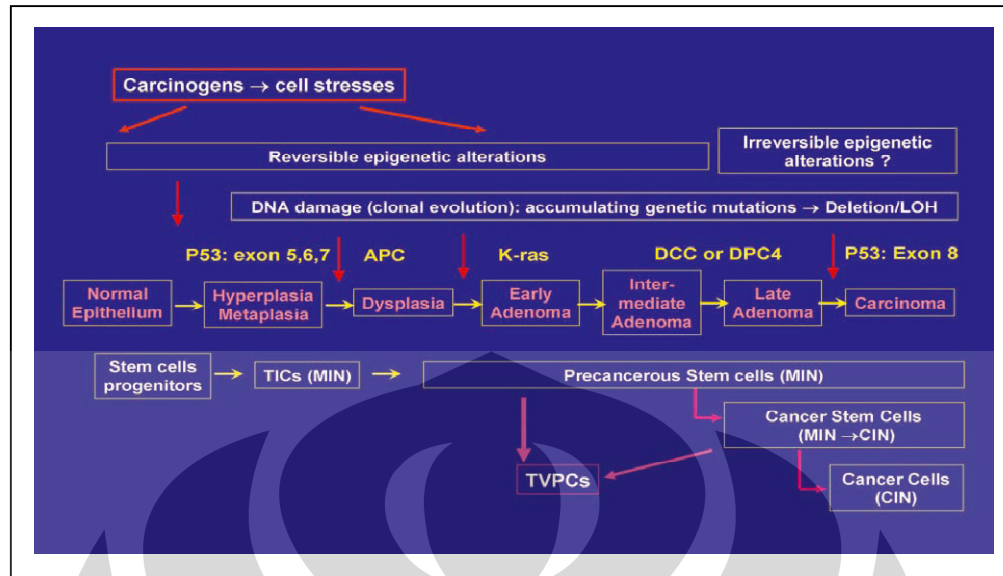
Pada awalnya, kanker payudara tidak menimbulkan gejala. Paling umum, gejala yang pertama adalah benjolan, yang biasanya terasa jelas berbeda dari jaringan payudara di sekitarnya. Pada tahap awal, benjolan dapat bergerak bebas di bawah kulit ketika didorong dengan jari. Pada tahap lebih lanjut, benjolan biasanya melekat pada dinding dada atau kulit di atasnya. Dalam kasus ini, benjolan tidak dapat bergerak sama sekali atau tidak dapat dipindahkan secara terpisah dari kulit di atasnya. Perempuan dapat mendeteksi apakah mereka memiliki sedikit bahkan kanker yang melekat pada dinding dada atau kulit dengan mengangkat tangan mereka di atas kepala mereka sambil berdiri di depan cermin. Jika mengandung kanker payudara yang melekat pada dinding dada atau kulit, manuver ini dapat membuat kulit mengerut atau satu payudara tampak berbeda dari yang lain. Pada tahap selanjutnya, benjolan bengkak atau luka bernanah mungkin berkembang pada kulit. Kadang-kadang kulit di atas benjolan lesung pipit dan kasar dan tampak seperti kulit jeruk (*peau d'orange*) (Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy, 2008).

Pengobatan kanker payudara dilakukan bergantung pada tahap dan jenis kanker payudara. Pengobatan dapat berupa pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi radiasi. Biasanya digunakan satu atau lebih macam pengobatan untuk mendapatkan hasil yang lebih memuaskan.

2.2. Sel Punca Kanker

Sel kanker telah lama dikenal sebagai populasi sel-sel yang memiliki fenotipe heterogen baik morfologi maupun fungsinya. Sebagian besar sel yang membentuk tumor dapat berdiferensiasi, namun sebagian kecil populasi sel tumor – kemudian dikenal sebagai sel punca kanker atau *cancer stem cell* – yang memiliki kemampuan memperbarui diri (*self-renewal*) yang ekstensif dan dapat merekapitulasi patofisiologi tumor pada hewan coba (Al Hajj et al., 2003, Tang, Beng, dan Shazib, 2007).

Hipotesis sel punca kanker (Gambar 2.2) mengatakan bahwa tumor berasal dari sel punca normal atau sel progenitor melalui disregulasi proses *self-renewal*. Hipotesis sel punca kanker menekankan bahwa hanya sebagian kecil populasi sel kanker yang dapat tersusun kembali menjadi sel tumor yang baru, sedangkan sebagian besar sel kanker yang lain mempunyai kapasitas yang terbatas dalam berpoliferasi dan berdiferensiasi. Kanker yang dikembangkan dari sel punca kanker yang berasal dari sel tumor awal (*Tumour Initiating Cell*) yang diinduksi oleh karsinogen. Sel tumor awal berupa sel punca normal atau sel progenitor dan dapat memperoleh sifat *stemness* ketika berkembang menjadi pra sel punca kanker. Adanya akumulasi epigenetik dan perubahan genetik, sel tumor awal dapat berkembang menjadi pra sel punca kanker, dengan tingkat keganasan dan diferensiasi tergantung pada kondisi lingkungan. Sebuah mutasi kualitatif onkogen atau gen supresor tumor pada pra sel punca kanker dapat menyebabkan berkembangnya pra sel punca kanker menjadi sel punca kanker yang kemudian menjadi sel tumor dengan heterogenitas selular karena mempunyai kapasitas berpoliferasi dan berdiferensiasi, serta membentuk kembali tumor baru pada lokasi yang jauh dari tempat tumor awal berasal. Secara histologis, poliferasi sel awal tumor dapat menyebabkan hiperplasia dan metaplasia, sedangkan proses berkembangnya sel awal tumor menjadi pra sel punca kanker mungkin bertanggung jawab pada displasia yang akan menyebabkan pra sel punca kanker menjadi sel punca kanker yang berkembang menjadi karsinoma yang ireversibel. Selain itu, pra sel punca kanker dan sel punca kanker dapat berkembang menjadi prekursor tumor yang lain seperti tumor vaskulogenesis (Jian, 2008).



[Sumber: Jian Xi Gao, 2008]

Keterangan : TICs : Tumour Initiating Cells ; LOS : Loss of Heterozygosity ;
 MIN : Micro-Satelit Instability ; CIN : Chromosomal Instability ; TVPCs:
 Tumour Vasculogenic Stem/Progenitor Cells.

Gambar 2.2. Hipotesis Sel Punca Kanker.

Hipotesis sel punca kanker didukung oleh bukti-bukti yang menunjukkan bahwa gen BRCA1 yang terlibat pada kanker payudara herediter ternyata berperan sebagai regulator nasib sel punca atau sel progenitor payudara normal. Kemudian suatu studi mendemonstrasikan bahwa sel punca kanker pada kanker payudara herediter (ditandai dengan BRCA1) juga bersifat heterogen, karena kemungkinan besar berasal dari sel-sel yang berbeda, misalnya mengandung sel punca $CD44^+/CD24^-$ dan sel punca $CD133^+$ (Wright et al., 2008). Walaupun kedua populasi sel punca tersebut berbeda asalnya, namun keduanya memiliki gen-gen “stemness” yang umum, seperti OCT3/4, Notch1, ALDH1, *Fgfr1* dan SOX1 (Ginestier, 2007).

Ekspresi gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc diketahui dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel-sel yang telah terdiferensiasi seperti fibroblast, yang disebut dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Keterkaitan ekspresi SOX2 dengan kanker payudara sporadik dengan basal-like phenotype telah diteliti (Rodriguez-Pinilla, 2007), namun pada umumnya

publikasi yang melaporkan tingkat ekspresi maupun polimorfisme gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc masih sulit ditemukan.

Walaupun keberadaan subpopulasi sel punca pada kanker telah diketahui, namun kemaknaan klinis dari temuan tersebut belum dapat dijelaskan dengan baik. Dugaan utama model sel punca kanker adalah perilaku klinis seharusnya sangat bergantung pada populasi sel punca kanker, baik secara kuantitatif (jumlah relatif atau absolut sel punca kanker) maupun kualitatif yang berhubungan dengan gambaran biologis sel punca kanker (Tang, Beng, dan Shazib, 2007). Kegagalan terapi radiasi ternyata disebabkan karena tidak dapat membunuh subpopulasi sel CD133⁺ yang menginisiasi tumor.

2.3. Gen SOX2

SOX2 adalah gen tanpa intron yang terletak dalam sebuah intron dari gen yang disebut SOX2 overlapping *transcript* (SOX2OT). Gen SOX2 berada pada kromosom manusia 3q26.3-q27 (Gambar 2.3) menghasilkan produk SRY (wilayah penentuan kromosom Y)-box 2, yang terdiri 317 asam amino panjang (34,3 kDa), merupakan domain grup mobilitas tinggi (*High Mobility Genes* - HMG) yang berisi transkripsi faktor totipotent dan mengontrol status pluripoten sel (Rodda, 2005). Gen ini banyak ditemukan pada banyak hewan dan memainkan peran penting dalam sel punca, organogenesis dan pertumbuhan (Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000, Wegner, 1999).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657, 12 Mei 2010]

Gambar 2.3. Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia.

SOX2, SRY (wilayah penentuan kromosom Y)-box 2, POU5F1/OCT4, dan faktor transkripsi lain, membentuk kompleks trimerik dalam daerah promotor gen yang mengatur perkembangan embrionik dan pluripotensi. Kompleks SOX2 - OCT4 merupakan komponen utama dalam mengatur jaringan genetic pluripotent (Rodda, 2005). SOX2 bersama OCT4 bekerja pada tahap awal embriogenesis, tepatnya pada awal stadium morula. Faktor-faktor ini ditemukan di *inner cell*

mass (ICM) di sel blastosit pada embrio pre-implantasi. Ekspresi dari kedua faktor terlihat dalam epiblast, jaringan yang berdiferensiasi menjadi embrio, dan sel-sel germinal setelah blastosit berimplantasi. Pentingnya SOX2 dan OCT4 sebagai regulator yang bertanggung jawab terhadap pluripotensi sel telah secara dramatis diilustrasikan dan didemonstrasi bahwa faktor-faktor ini bersama-sama dengan c-Myc dan Klf4 atau Nanog dan LIN28 dapat mempengaruhi diferensiasi dari sel somatik menjadi *induced Pluripotency Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007).

Sejauh ini telah banyak ditemukan hubungan antara faktor transkripsi SOX2 dan kanker pada manusia (Dong, Wilhelm, dan Koopman, 2004). Contohnya, SOX2 telah ditemukan sebagai antigen immunogenik pada 41% pasien kanker paru-paru (Gure et al., 2000) dan 29% pasien meningioma (Comtesse et al., 2005). Hasil *immunohistochemistry* menemukan bahwa SOX2 berperan dalam stadium lanjut karsinogenesis seperti invasi dan metastasis dari *pancreatic intraepithelial neoplasia* (Sanada et al., 2006). SOX2 juga berperan dalam *gastric carcinogenesis* (Li, 2004) dan kanker prostat (Sattler et al., 2000). Lebih jauh lagi ekspresi SOX2 yang berlebihan juga ditemukan pada 43% *basal cell-like breast carcinoma* (Rodriguez-Pinilla et al., 2007).

Bagaimana SOX2 mempunyai sifat onkogenik belum diketahui secara pasti. Protein SOX termasuk dari SOX2 berikatan pada sekuens DNA spesifik (C(T/A)TTG(T/A)(T/A)) dan domain HMG yang dimiliki SOX berfungsi sebagai faktor transkripsi yang berfungsi untuk mengaktifkan atau menekan ekspresi gen (Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000, Wilson dan Koopman, 2002). Namun aktifitas transkripsi dari keluarga protein SOX ini membutuhkan protein lain untuk memfasilitasi dan menstabilkan formasi dari kompleks inisiasi transkripsi SOX. Keberadaan protein SOX yang berpasangan dengan protein lain dipercaya sebagai penentu fungsi spesifik dan jaringan target dari keluarga SOX. Oleh karena itu, sangat penting untuk mengetahui protein yang berpasangan dengan protein SOX untuk mengetahui aktifitas patofisiologi dari protein SOX tersebut (Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000, Wilson dan Koopman, 2002).

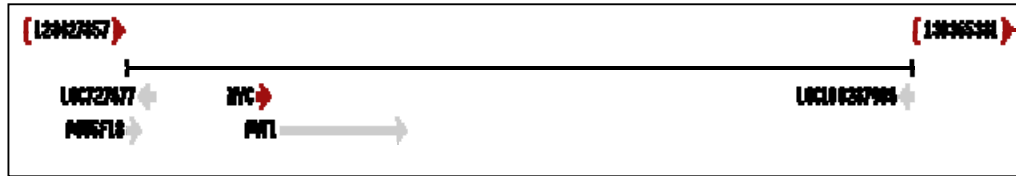
Pada suatu studi yang dilakukan oleh Yupeng Chen, dkk (2008) dengan mempelajari 56 sampel sel kanker payudara dan 19 sampel sel payudara normal, diketahui bahwa peningkatan ekspresi gen SOX2 berkorelasi dengan peningkatan tingkat keparahan kanker payudara yaitu ditemukan pada 3 dari 9 sampel (33,3%) ductal carcinoma in situ, 11 dari 26 (42,3%) kanker stadium II dan 12 dari 21

(57,1%) kanker stadium III. Pada studi yang sama juga diketahui bahwa SOX2 menyebabkan proliferasi sel kanker payudara dengan memfasilitasi transisi G1/S dan meregulasi ekspresi gen cyclin D1 (CCND1). Studi ini juga menemukan bahwa protein SOX2 berpasangan dengan protein β -catenin dalam mengaktivasi gen CCND1.

2.4. Gen c-Myc

Tahun 1911 Peyton Rous mengamati bahwa sarkoma pada ayam dapat ditularkan melalui ekstrak bebas sel dari tumor, menunjukkan bahwa virus bisa menjadi agen etiologi sarkoma ini. Oleh Bishop dan rekan kerjanya, studi tertentu mengenai retrovirus subkelompok unggas, yang menginduksi myeloid leukemia, sarkoma, hati, ginjal, dan tumor pada ayam lainnya, mengarah pada identifikasi v-myc onkogen. Penemuan gen yang homolog, disebut c-Myc, di ayam mendukung hipotesis bahwa retrovirus onkogenik unggas dapat menginduksi gen pengatur pertumbuhan selular. Temuan bahwa kanker manusia seringkali mengekspresikan c-Myc secara berbeda menekankan pentingnya gen ini dalam penyebab kanker pada manusia (Gardner, Lee, dan Dang, 2002).

Kemajuan signifikan telah dibuat selama dua dekade terakhir dalam pemahaman kita tentang fungsi c-Myc dalam sel-sel normal dan sel-sel kanker. Berbeda dengan regulasi gen c-Myc dalam sel-sel normal, yang hanya mengekspresikan gen ketika sel-sel aktif membelah, sel-sel kanker dapat mengekspresikan gen dalam mode yang tidak terkontrol sebagai akibat penyimpangan genetik. Sekarang telah diketahui bahwa deregulasi ekspresi c-Myc memainkan peran penting dalam perkembangan kanker manusia. Protein c-Myc atau gen c-Myc yang terekspresikan berlebih terjadi dalam berbagai jenis kanker pada manusia dengan insiden 80% dari kasus kanker payudara, 70% dari kasus kanker usus besar, 90% dari kasus kanker ginekologis, 50% dari kasus karsinoma hepatoseluler dan berbagai tumor hematological lainnya yang memiliki ekspresi c-Myc yang abnormal (Gardner, Lee, dan Dang, 2002).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609, 12 Mei 2010]

Gambar 2.4. Letak Gen c-Myc pada Kromosom Manusia.

Gen c-Myc terletak di kromosom manusia 8q24 (Gambar 2.4), terdiri dari tiga ekson. Translasi pada situs awal AUG di ekson kedua menghasilkan 439 asam amino besar dan 64 kDa protein c-Myc. Ekspresi c-Myc dalam sel normal diatur oleh sinyal eksternal, seperti faktor-faktor pertumbuhan dan kontak matriks ekstraselular, serta jam internal, seperti siklus sel. Sel yang sedang beristirahat biasanya mengekspresikan c-Myc dalam jumlah kecil, sedangkan sel dirangsang oleh faktor-faktor pertumbuhan secara dramatis meningkatkan ekspresi c-Myc sebagai respons awal gen. Ekspresi abnormal atau berlebihan dari c-Myc akan mengaktifkan sel-sel utama untuk menginduksi p19/p14ARF dan p53-*dependent* sehingga sel mati. Oleh karena itu, sel-sel normal yang mengekspresikan c-Myc secara berlebihan dihilangkan dari organisme melalui apoptosis, sehingga melindungi organisme dari perubahan neoplastik mematikan.

Pengaktifan gen c-Myc, yang berkontribusi pada perkembangan kanker manusia, terjadi dalam beberapa cara. Kromosom translokasi, seperti dalam kasus limfoma Burkitt, mengaktifkan c-Myc lokus yang berdekatan dengan gen imunoglobulin. Amplifikasi gen meningkatkan jumlah kopi gen myc yang pada gilirannya akan meningkatkan ekspresi myc. Hal paling dramatis yang ditemukan anggota lain dari keluarga myc, di mana lebih dari 200 kopi per sel dari N-myc dapat ditemukan dalam neuroblastoma, dan lebih dari 50 eksemplar per sel dari c-Myc, N-myc, atau L-myc ditemukan dalam sel kecil kanker paru-paru (Gardner, Lee, dan Dang, 2002).

2.5. Ekstraksi RNA

RNA merupakan makromolekul biologis yang memiliki sejumlah fungsi yang berbeda. Messenger RNA (mRNA), ditranskripsi dari DNA, berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis protein. Sintesis protein dilakukan oleh ribosom, yang terdiri dari RNA ribosomal (rRNA) dan protein. Asam amino untuk sintesis

protein dikirim ke ribosom oleh RNA transfer (tRNA) molekul. Sebuah sel mamalia berisi 10-30 pg total RNA. Sebagian besar molekul RNA terdiri atas tRNA yaitu sebanyak 15-20% dan rRNA sebanyak 80-85% dari total RNA. Sedangkan mRNA hanya 1-5% dari total RNA meskipun jumlah yang sebenarnya tergantung pada jenis dan kondisi fisiologis sel. Dibandingkan dengan DNA yang jumlahnya relatif stabil, RNA khususnya mRNA jumlahnya dapat berubah-ubah sesuai kondisi lingkungan. Oleh karena itu, analisis pada mRNA dapat dijadikan gambaran ekspresi suatu gen (Alberts et al., 1994).

Metode untuk isolasi RNA hampir sama dengan metode isolasi DNA, namun karena RNA relatif tidak stabil dan mudah rusak terutama oleh RNAase yaitu suatu molekul yang sangat stabil, tidak membutuhkan kofaktor, sangat efektif pada konsentrasi rendah dan banyak terdapat pada debu dan kulit manusia. Oleh karena itu, ketika akan melakukan ekstraksi RNA diharuskan memakai sarung tangan untuk menghindari kontaminasi RNAase. Pada ekstraksi RNA dilakukan deproteinisasi untuk memisahkan RNA dari protein dan penambahan DNase untuk merusak DNA sehingga selanjutnya RNA dapat diendapkan dengan etanol. Salah satu reagen khusus yang umumnya digunakan dalam ekstraksi RNA adalah guanadinium tiosianat yaitu suatu detergen yang dapat mendenaturasi protein dan inhibitor RNase yang baik (Walker dan Rapley, 2000).

Konsentrasi RNA dapat dihitung dengan menggunakan spektrofotometri UV dengan cara yang sama dengan yang digunakan untuk DNA. Namun dalam penghitungan konsentrasi RNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dan 1 unit absorbansi setara dengan 40 ug/ml RNA. Kemurnian RNA dapat dilihat dari nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm atau yang disebut dengan A_{260}/A_{280} . Nilai perbandingan harus ~ 2.1 yang menandakan bahwa RNA tersebut telah murni. Namun nilai perbandingan ini dapat terpengaruh oleh pH. Pada pH yang lebih rendah akan menyebabkan nilai A_{260}/A_{280} menjadi lebih rendah dan mengurangi sensitifitas dalam mengukur kontaminasi protein. Oleh karena itu, sebaiknya RNA diukur dalam larutan buffer untuk menjaga kondisi pH (Wilfinger, Mackay, dan Chomczynski, 2000).

2.6. Normalisasi mRNA

Salah satu metode untuk analisis ekspresi gen adalah analisis RNA, metode umum untuk analisis RNA adalah Northern blotting dan hibridisasi in situ

(Parker & Barnes, 1999), *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Weis et al., 1992), *Rnase protection assay* (Hod, 1992), dan *quantitatif Real Time – Polymerase Chain Reaction* (qPCR) (Bustin, 2002). Namun, terdapat banyak masalah dalam analisis RNA, salah satunya adalah variasi yang terjadi dalam ekstraksi RNA yang akan mempengaruhi jumlah mRNA yang akan diamplifikasi. Penentuan ini penting karena mRNA adalah cetakan yang digunakan untuk mensintesis cDNA oleh enzim *reverse transcriptase* yang selanjutnya akan diubah menjadi *double strand* DNA oleh *Taq Polymerase*. Variasi pada jumlah mRNA ini akhirnya akan mempengaruhi analisis level RNA. Oleh karena itu, diterapkan beberapa strategi atau disebut normalisasi untuk meminimalisir variasi yang mungkin yang terjadi. Beberapa langkah normalisasi yang pernah dilakukan adalah menyeragamkan jumlah sel yang akan diekstraksi. Langkah ini dianggap sebagai langkah awal dalam normalisasi walaupun menyeragamkan jumlah sel ini tidak menjamin dapat meminimalisir variasi yang mungkin terjadi (Huggett et al., 2005). Langkah selanjutnya yang dapat dilakukan dalam normalisasi adalah penyeragaman jumlah total RNA yang akan digunakan dalam proses RT-PCR. Penyeragaman ini penting karena masukan untuk proses RT-PCR harus sama agar pengukuran level RNA yang dilakukan lebih akurat (Bustin, 2000). Selain penyeragaman jumlah RNA, kontrol terhadap kualitas RNA juga perlu dilakukan untuk menjamin kemurnian total RNA (Bustin dan Nolan, 2004). Langkah lainnya adalah normalisasi atau standarisasi mRNA dengan menggunakan *housekeeping genes* sebagai indikator (Radonic, et al., 2004). Ekspresi *housekeeping genes* ini telah dipelajari baik dalam sel normal maupun sel kanker yang penggunaannya terbukti efektif dalam mengontrol variasi yang terjadi pada analisis RNA (Gale, 2005).

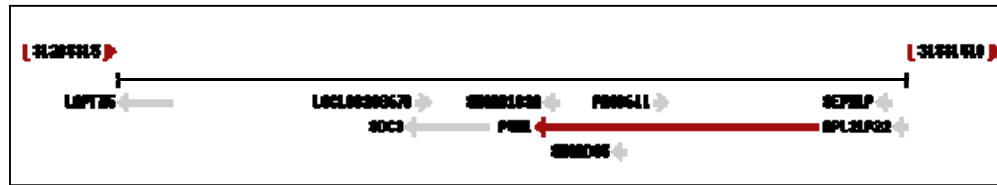
Housekeeping genes bertanggung jawab atas pemeliharaan dan aktivitas sel dan produknya penting bagi fisiologi sel. Gen ini disebut *housekeeping genes* karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan fungsional umum dan penting di sebagian besar tipe sel dan tidak bergantung pada histologi sel. *Housekeeping genes* yang dapat digunakan antara lain komponen sitoskeleton (β -actin), *major histocompatibility complex* (β -2-microglobulin), jalur glikolisis ((glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)), sintesis purin (hypoxanthin ribosyltransferase), *protein folding* (cyclophilin), atau sintesis subunit ribosom (rRNA) (Vandesompele, 2002).

Housekeeping genes yang ideal adalah ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada kondisi percobaan yang berbeda. Oleh karena itu, tidak semua *housekeeping genes* dapat digunakan sebagai indikator tetap atau penanda ekspresi. Sebagai contoh, enzim ekspresi GAPDH telah banyak digunakan sebagai penanda kontrol ekspresi karena dianggap stabil ekspresinya. Namun demikian, suatu studi (Gale, 2005) menganalisis ekspresi GAPDH pada sekitar seratus sampel normal, displastik dan tumor jaringan melalui eksperimen hibridisasi in situ. Mereka menemukan bahwa, dalam kenyataannya, ekspresi GAPDH semangkin meningkat pada sampel normal, displastik dan tumor sehingga dapat disimpulkan secara khusus bahwa GAPDH tidak dapat digunakan sebagai kontrol yang tepat untuk studi ekspresi. Sedangkan pada suatu studi yang lain (Revilion et al., 2000) melaporkan bahwa GAPDH pada kanker payudara diregulasi oleh estradiol dan menunjukkan ekspresinya bergantung pada dosis estradiol yang diberikan sehingga penggunaan GAPDH sebagai *housekeeping genes* pada kanker payudara tidak tepat.

Pada penelitian ini, kami menggunakan *Housekeeping genes* PUM1 (Pumilio homolog *Drosophila* varian 1). Pemilihan ini didasarkan pada dua studi sebelumnya. Pada studi yang pertama (Lyng et al., 2008) dimana menggunakan 8 *housekeeping genes* yang diuji pada 33 sampel sel kanker payudara dan hasilnya dianalisis dengan menggunakan statistik deskriptif yaitu geNorm dan NormFinder. Hasilnya menunjukkan bahwa gen PUM1 adalah *housekeeping genes* yang relatif konstan terhadap semua kombinasi sampel. Sedangkan pada studi yang kedua (McNeill, Miller, dan Kerin, 2007) yang menggunakan 12 *housekeeping genes* yang diuji terhadap 27 sampel sel kanker payudara dan dianalisis dengan dua model statistik yang berbeda. Hasilnya juga menunjukkan bahwa PUM1 adalah gen yang paling stabil dan dapat digunakan sebagai internal kontrol (*housekeeping genes*).

PUM1 merupakan gen yang terletak dalam kromosom manusia 8q24.21 (Gambar 2.6) dan mengkode keluarga protein PUF yang memiliki peran penting dalam proses pengikatan RNA. Protein ini memiliki hubungan dengan protein Pumilio pada *Drosophila*. Protein yang dikode oleh PUM1 ini memiliki bagian khusus untuk mengikat RNA dan menjadi regulator translasi dengan mengikat pada ujung 3' mRNA yang tidak diterjemahkan. Penemuan gen ini pada

manusia diduga berperan penting dalam embriogenesis, pertumbuhan dan diferensiasi sel (National Center of Biotechnology Information, 2010).



[www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 12 Mei 2010]

Gambar 2.5. Letak Gen PUM 1 pada Kromosom Manusia.

2.7. complementary DNA (cDNA)

RNA merupakan parameter yang sering digunakan dalam ekspresi gen contohnya mengukur jumlah RNA dengan metode *Northern analysis* dan *nuclease protection* yang menggunakan probe DNA atau RNA. Namun metode ini punya kelemahan yaitu (i) RNA relatif tidak stabil dan (ii) RNA tidak dapat diamplifikasi secara langsung. Oleh karena itu, RNA dikonversi menjadi complementary DNA (cDNA) yang merupakan molekul yang lebih stabil dibandingkan RNA sehingga lebih mudah dalam penyimpanan jangka panjang (Fairell, 2005).

cDNA adalah molekul berutas tunggal yang merupakan produk sintesis enzimatis *in vitro* dengan RNA sebagai cetakan. Sintesis cDNA terjadi melalui dua langkah, yaitu (i) mRNA diinkubasi dengan *reverse transcriptase*, suatu enzim yang memerlukan mRNA sebagai cetakan untuk sintesis cDNA. Oligo(dT), yang terdiri dari rangkaian pendek basa timin, digunakan sebagai primer karena mRNA eukariotik selalu mempunyai rangkaian nukleotida adenine pada ujung 3'; (ii) cDNA yang dihasilkan masih berikatan dengan mRNA sehingga mRNA harus dihilangkan dengan cara dihidrolisis dengan alkali atau enzim sehingga didapat cDNA berutas tunggal (Gilbert, 2006).

Enzim *reverse transcriptase* yang digunakan untuk mensintesis cDNA dikenal dengan "RNA-dependent DNA polymerase". Ada beberapa jenis enzim *reverse transcriptase* yang dapat digunakan, yaitu (i) AMV yang didapat dari virus *Avian Myeloblastosis*; (ii) MMLV yang didapat dari virus *Moloney Murine Leukemia*; (iii) Modified RNase H- Enzyme; (iv) *rTth* yang diperoleh dari *Thermus thermophilus* (Mn^{2+} dependen). Penggunaan enzim tersebut mempunyai beberapa keuntungan dan kerugian, AMV misalnya tahan pada temperature 50°C

atau lebih dan cocok untuk mentranskripsi cetakan yang lebih pendek namun mempunyai aktifitas RNase H yang tinggi yang dapat mendegradasi komponen RNA pada hybrid RNA:DNA sehingga dapat mengganggu proses sintesis cDNA, oleh karena itu aktifitas RNase H yang tinggi dianggap sebagai kontaminan. Sifat yang sebaliknya dimiliki MMLV, mempunyai aktifitas RNase H yang rendah dan hanya tahan pada suhu 37-40°C yang hanya bisa digunakan untuk cetakan yang lebih panjang (Fairell, 2005).

Untuk mencapai sintesis cDNA yang efektif maka diperlukan penggunaan primer yang tepat. Pemilihan primer oligo(dT) untuk cetakan total RNA biasanya lebih dipilih karena dapat mencegah enzim transcriptase untuk mentranskripsi cDNA dari cetakan non-mRNA. Primer oligo(dT) yang mempunyai rangkaian pendek basa timin merupakan primer yang selektif untuk rangkaian poly A+ yang hanya dimiliki mRNA. Beberapa syarat primer yang ideal yaitu (i) Suhu leleh (T_m) berada pada rentang 52- 65°C; (ii) tidak mempunyai kemampuan dimer; (iii) tidak membentuk formasi *hairpin* yang signifikan (> 3bp); (iv) tidak mempunyai *secondary priming site*; (v) tidak mempunyai *specific binding site* pada ujung 3' sehingga tidak terjadi *mispriming*; (vi) mempunyai panjang 18-28 pasangan basa; (vii) sebaiknya komposisi basa G+C berkisar 50-60% dan sebaiknya dihindari sekuens kaya (A+T) dan (G+C) yang terlalu panjang (Aplication Manual, 1995).

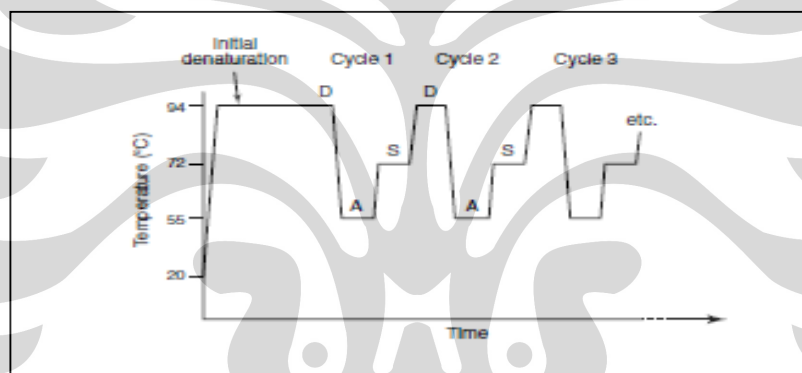
2.8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik yang paling sering digunakan dalam molekular biologi karena cepat, tidak mahal dan simpel (Erlich, 1989). PCR dapat mengamplifikasi DNA cetakan menjadi jutaan kopi hanya dalam beberapa jam saja. Oleh karena itu PCR sangat sering digunakan pada studi tentang penyakit menular, mutasi gen, forensik, dan aktivitas transkripsi dalam sel dan jaringan dengan menggunakan RNA sebagai parameter ekspresi gen.

Komponen-komponen yang diperlukan dalam proses PCR adalah (i) DNA cetakan (*template* DNA), yaitu fragmen DNA yang mengandung daerah sekuens tertentu yang akan diamplifikasi; (ii) dua primer oligonukleotida, yaitu segmen DNA berutas tunggal (15-25 basa nukleotida) yang menentukan bagian awal dan akhir dari daerah yang akan diamplifikasi; (iii) enzim DNA yang stabil terhadap pemanasan. Umumnya digunakan *Taq Polymerase* yang didapat dari *Thermus aquaticus*. Enzim ini akan menyalin bagian yang akan diamplifikasi; (iv)

deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang digunakan DNA polymerase untuk membentuk DNA baru. dNTP terdiri dari empat macam nukleotida, yaitu dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP; (v) kation Mg^{2+} yang diperlukan oleh *Taq Polymerase* untuk penambahan nukleotida; (vi) larutan penyangga yang umumnya mengandung 10 mM Tris pH 8,4, dan 50 mM KCl (Erlich, 1989).

Secara garis besar PCR terdiri dari tiga langkah (Application Manual, 1995) yaitu: (i) denaturasi, yaitu pemanasan awal pada suhu $95^{\circ}C$ untuk mendenaturasi kompleks DNA secara komplit. (ii) Penempelan primer (*primer annealing*) pada temperature $55-72^{\circ}C$, (iii) Polimerisasi untai baru DNA oleh *Taq polymerase*, yaitu secara normal dilakukan pada temperatur $72^{\circ}C$ (merupakan temperatur optimal *Taq polymerase*). Jumlah siklus yang diperlukan oleh sebagian besar PCR adalah 25-40 siklus.

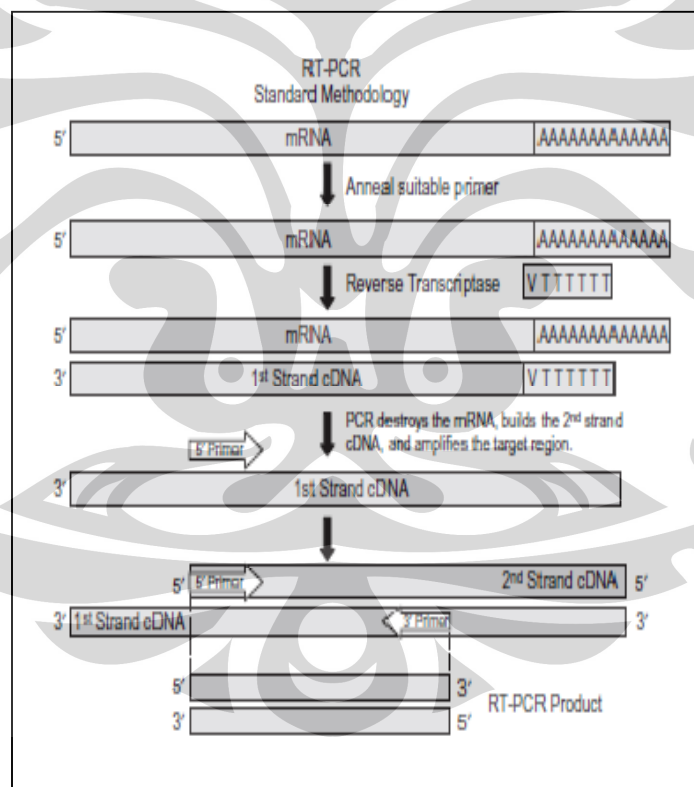


[Sumber : McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.6. Kurva Proses PCR.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) adalah suatu teknologi dimana molekul RNA dikonversi menjadi sekuens complementary DNA (cDNA) dengan menggunakan *reverse transcriptase* (RT), dan cDNA yang terbentuk diampifikasi dengan prinsip yang sama dengan PCR standar. Metode ini mempunyai keunggulan lain jika dibandingkan dengan metode tradisional lainnya dalam menganalisa RNA yaitu dapat digunakan untuk analisa kuantitatif. Selain itu, keuntungan lainnya adalah tingkat sensitifitasnya yang tinggi dapat menganalisa RNA dalam jumlah yang sedikit dan dalam waktu yang relatif singkat (Fairell, 2005).

RT-PCR terdiri dari dua proses, yaitu (i) sintesis cDNA dari RNA dengan menggunakan *reverse transcriptase* (MMLV, AMV, *Modified RNase H- Enzyme* atau Mn^{2+} dependent). Pada proses ini terdiri RNA ditambahkan primer yang sesuai kemudian dilakukan pemanasan pada suhu $70^{\circ}C$ selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA, diinkubasi pada suhu $25^{\circ}C$ selama 5 menit untuk proses penempelan primer dan terakhir dipanaskan pada suhu $95^{\circ}C$ selama 5 menit untuk menginaktifkan *reverse transcriptase*; (ii) amplifikasi cDNA. Pada proses ini terjadi proses denaturasi, annealing primer (penempelan primer) dan polimerasi oleh *Taq polymerase* (Fairell, 2005). Selanjutnya cDNA diperbanyak dengan proses PCR standar untuk mendapatkan produk yang cukup besar untuk dapat dideteksi. Mekanisme proses PCR standar dapat dilihat pada gambar 2.9.



[Sumber : Fairell, 2005]

Gambar 2.7. Proses RT-PCR

2.8.1. Optimasi PCR

Tidak ada satupun protokol PCR yang dapat digunakan dalam segala kondisi. Oleh karena itu, untuk mendapatkan hasil yang optimum membutuhkan optimasi terlebih dahulu. Beberapa masalah yang sering terjadi dalam proses PCR adalah tidak munculnya amplikon yang diinginkan, pita amplikon tidak spesifik, pita amplikon yang dihasilkan berbentuk *smear* dan pita amplikon hanya kelihatan tipis sekali. Banyak faktor yang menyebabkan masalah tersebut dan tabel menyediakan solusi yang dapat dilakukan dalam mengatasi masalah yang terjadi dalam proses PCR.

Optimasi PCR tidak dapat dilepaskan dari beberapa parameter diantaranya adalah konsentrasi ion magnesium, konsentrasi ion lain, konsentrasi dNTP, konsentrasi enzim, denaturasi, pelekatan primer, pemanjangan primer, jumlah siklus, primer, kualitas RNA cetakan, PCR *enhancers*, dan kontaminasi.

2.8.1.1. Konsentrasi Ion Magnesium

Konsentrasi ion magnesium memainkan peran penting dalam proses PCR. Ion magnesium akan berikatan dengan dNTP dan membentuk kompleks dNTP-Mg²⁺ yang akan berinteraksi dengan gugus gula dan fosfat yang merupakan tulang punggung pada asam nukleat dan akan mempengaruhi kerja DNA *polymerase* karena enzim tersebut membutuhkan ion magnesium untuk dapat berikatan dengan DNA cetakan, primer dan dNTP. Selain itu konsentrasi primer akan mempengaruhi pemisahan rantai baik pada DNA cetakan maupun amplikon. Oleh karena itu, dengan mengoptimasi konsentrasi ion magnesium akan menghasilkan amplikon yang lebih baik. Konsentrasi ion magnesium yang disarankan adalah 0,5 mM - 5 mM. Konsentrasi ion magnesium ini disesuaikan dengan konsentrasi dNTP. Jika konsentrasi dNTP ditambah maka sebaiknya konsentrasi ion magnesium juga ditambah sesuai dengan kenaikan jumlah konsentrasi dNTP. Rendahnya konsentrasi ion magnesium akan menyebabkan turunnya akurasi dari enzim DNA *polymerase* yang akhirnya mengarah kepada amplifikasi amplikon yang tidak spesifik (McPherson dan Moeller, 2006).

2.8.1.2. Konsentrasi ion lain

Sebuah studi yang dilakukan oleh Blanchard, *et al.* (1993) menunjukkan bahwa dibutuhkan ion lain dalam optimasi proses PCR. Mereka menggunakan

buffer yang disebut TNK -yang mengandung Tris-HCl (pH 8.3), ammonium klorida (NH_4Cl), kalium klorida (KCl) dan magnesium klorida (MgCl_2)- dan menganalisa efek berbagai konsentrasi masing-masing ion terhadap amplikon yang dihasilkan dalam proses PCR. Hasil yang ditemukan bahwa KCl dapat menurunkan ikatan double strand DNA sehingga akan menurunkan temperature denaturasi dengan cara menetralkan muatan negatif gugus phosphate. Namun pada konsentrasi KCl yang tinggi (0,2 M) akan menyebabkan DNA tidak akan terdenaturasi pada suhu 94°C dan dapat menyebabkan tidak ada amplikon yang terbentuk (McPherson dan Moller, 2006).

2.8.1.3. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi enzim mempengaruhi amplikon yang dihasilkan. Jika amplikon yang dihasilkan terlalu tipis mungkin terjadi karena konsentrasi enzim yang dihasilkan sedikit. Sebaliknya jika konsentrasi enzim terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya amplikasi amplikon yang tidak spesifik (Fairell, 2005).

Konsentrasi optimum enzim *reverse transcriptase* adalah 100-200 unit/ μl . sedangkan kondisi optimum untuk DNA *polymerase*, dalam hal ini *Taq polymerase* adalah 1-2 unit/ μl .

2.8.1.4. Konsentrasi dNTP

Konsentrasi optimum dNTP adalah 400 μM dengan konsentrasi dATP 10 mM, dTTP 10 mM, dGTP 10 mM dan dCTP 10 mM. Keempat komponen dNTP harus memiliki konsentrasi yang ekuivalen untuk mengurangi terjadinya kesalahan penggabungan nukleotida (McPherson dan Moller, 2006).

2.8.1.5. Denaturasi

Proses denaturasi adalah proses mutlak dalam proses PCR. Proses ini bertujuan untuk mendenaturasi DNA menjadi *single strand* yang akan memfasilitasi ke langkah berikutnya yaitu proses perlekatan. Proses denaturasi biasanya didahului oleh proses inisialisasi pada suhu 95°C selama 5 menit. Jika langkah ini tidak sempurna dilaksanakan maka kemungkinan ada sebagian DNA yang tidak terdenaturasi dan hal ini akan menghambat proses perlekatan primer dan pemanjangan oleh DNA *polymerase*. Kemudian dilanjutkan pada proses denaturasi akhir pada suhu 94°C selama 15 detik. Suhu yang terlalu tinggi dan

waktu denaturasi yang terlalu lama akan mempengaruhi aktivitas enzim (Fairell, 2005).

2.8.1.6. Perlekatan (*Annealing*)

Proses perlekatan dalam PCR bertujuan agar primer dapat berikatan dengan sekuens spesifik pada DNA cetakan. Proses perlekatan dapat terjadi jika suhu perlekatan tidak melebihi T_m . Temperature yang digunakan biasanya 5°C dibawah T_m .

Untuk optimasi suhu pada proses perlekatan dapat dimulai dari suhu 55°C . Jika hasil amplikon terlalu tipis kemungkinan suhu perlekatan terlalu tinggi sehingga enzim kehilangan aktivitasnya. Sebaliknya jika suhu perlekatan terlalu rendah maka akan terjadi amplikon yang tidak spesifik karena primer dapat melekat pada lebih dari satu daerah pada DNA cetakan (Fairell, 2005).

2.8.1.7. Pemanjangan (*Extension*)

Tujuan dari proses pemanjangan ini adalah mensintesis amplikon yang diinginkan dengan memperpanjang primer. Suhu yang diperlukan dalam proses ini adalah $68-72^\circ\text{C}$ selama 1 menit. Akan tetapi, waktu pemanjangan yang lebih lama akan dibutuhkan jika konsentrasi DNA cetakan sangat kecil (Fairell, 2005).

2.8.1.8. Jumlah Siklus

Jumlah siklus optimum pada proses PCR adalah berkisar antara 20-40 siklus. Jumlah siklus ini bergantung pada konsentrasi DNA cetakan yang digunakan. Penurunan jumlah siklus dapat meningkatkan kemungkinan terjadinya amplikon tidak spesifik. Sedangkan jika jumlah siklus terlalu kecil akan menyebabkan amplikon hasil PCR terlalu sedikit sehingga ketika dielektroforesis pita yang dihasilkan akan sangat tipis (McPherson dan Moller, 2006).

2.8.1.9. Primer

Primer yang digunakan biasanya memiliki panjang 18-25 nukleotida dengan kandungan G-C sebesar 50-60 %. Penggunaan rancangan primer yang memiliki pasangan basa yang berulang-ulang harus dihindari karena dapat menyebabkan masalah dalam spesifitas. Adanya nukleotida G dan C secara

berurutan pada ujung 3' juga sebaiknya dihindari karena akan menyebabkan primer-dimer sehingga amplicon yang dihasilkan tidak terlalu baik (Fairell, 2005).

Konsentrasi ideal untuk primer adalah 0,5-1 uM. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya pembentukan dimer dan amplicon yang tidak spesifik

2.8.1.10. Kualitas RNA cetakan

Kualitas RNA cetakan merupakan hal yang penting dalam proses RT-PCR sehingga perlu diperhatikan bagaimana menjaga agar kualitas RNA cetakan dalam kondisi yang baik. RNA cetakan sebaiknya disimpan pada suhu 50°-80°C untuk menjaga agar enzim RNase tidak aktif sehingga RNA tidak terdegradasi. Saat ekstraksi sebaiknya dipastikan RNA bebas dari etanol yang akan menghambat perlekatan dNTP pada saat proses pemanjangan. Kontaminasi dengan DNA juga harus diperhatikan karena akan mempengaruhi spesifitas dari primer yang digunakan ketika proses *reverse transcription*. Selain itu, konsentrasi RNA yang digunakan sebagai cetakan diusahakan agar tidak kurang dari 10 ng/ul untuk menjaga agar amplicon yang dihasilkan dapat dideteksi dengan elektroforesis (McPherson dan Moller, 2006).

2.8.1.11. PCR *enhancer*

PCR *enhancer* adalah bahan tambahan yang dapat meningkatkan efektifitas proses PCR sehingga hasil yang didapat lebih baik. PCR *enhancer* dapat meningkatkan spesifitas perlekatan primer, menurunkan kemungkinan mismatch primer dan meningkatkan jumlah amplicon yang diinginkan.

Bahan tambahan yang dapat digunakan sebagai PCR *enhancer* antara lain dimethyl sulfoxide (DMSO) 10%, formamide 5%, trimethylammonium chloride 10–100 µM (10), betaine (N,N,N-trimethylglycine) 1–1.3 M, detergen non ionik seperti Tween® 20 at 0.1–2.5%, polietilen glikol 6000 (PEG) 5–15%, dan gliserol 10–15% (McPherson dan Moller, 2006).

2.8.1.12. Kontaminasi

Banyak sumber kontaminasi yang dapat terjadi dalam proses PCR. Namun kontaminasi utama adalah adanya produk hasil PCR sebelumnya. Hal tersebut akan menyebabkan amplicon yang tidak spesifik ketika dielektroforesis.

Kontaminasi lain dapat berasal dari debu, kotoran bahkan dari bubuk yang berasal dari sarung tangan. Oleh karena itu ketika akan melakukan proses PCR sebaiknya gunakan sarung tangan dengan sedikit bubuk dan selalu bersihkan meja tempat bekerja dan alat yang digunakan baik sebelum dan sesudah bekerja (McPherson dan Moller, 2006).

2.9. Elektroforesis gel akrilamid

Elektroforesis adalah suatu gaya yang digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan perbedaan ukuran dan muatan molekul dengan melewati molekul pada matriks gel (Boyer, 2000). Molekul yang ingin dianalisis ditempatkan pada sumur kemudian dialiri muatan listrik dan hasilnya molekul akan bergerak dengan kecepatan yang bergantung pada massa dan muatan molekul.

Gel yang digunakan adalah polimer *crosslinked* yang mempunyai komposisi dan porositas yang dipilih berdasarkan struktur dan berat spesifik zat yang ingin dianalisis (Robyt, White, dan Bernard, 1990). Saat memisahkan protein atau asam nukleat (DNA, RNA atau oligonukleotida) gel yang digunakan biasanya mengandung komposisi yang berbeda antara akrilamid dan *crosslinker* sehingga menghasilkan poliakrilamid dengan porositas tertentu. Ketika zat yang ingin dipisahkan merupakan asam nukleat yang mempunyai pasangan basa yang lebih dari 1000, matrik gel yang digunakan adalah agarose yang dipurifikasi.

Akrilamid (amida akrilat) adalah senyawa organik sederhana dengan rumus kimia C_3H_5NO dan berpotensi berbahaya bagi kesehatan (menyebabkan kanker atau bersifat karsinogenik). Dalam bentuk murni akrilamid berwujud padatan kristal putih dan tidak berbau. Pada suhu ruang, akrilamid larut dalam air, etanol, eter, dan kloroform. Dalam keadaan normal akrilamid akan terdekomposisi menjadi amonia tanpa pemanasan atau menjadi karbon dioksida, karbon monoksida dan oksida nitrogen dengan pemanasan. Akrilamid dapat membentuk rantai polimer panjang yang dikenal dengan poliakrilamid, yang juga karsinogenik.

Gel akrilamid digunakan sebagai fase diam dalam gel elektroforesis dengan konsentrasi bervariasi yaitu 8%, 10% dan 12%. Gel yang sudah dibuat kemudian direndam dalam *chamber*, dilengkapi elektroda positif dan negatif, yang berisi larutan dapar lalu dialiri arus listrik. DNA bermuatan negatif sehingga

DNA akan bergerak menembus pori gel dari elektroda negatif menuju elektroda positif. Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh tegangan yang digunakan, konsentrasi akrilamid, dan ukuran DNA. Molekul yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang lebih besar. Untuk mengamati pemisahan yang terjadi digunakan pewarna, contohnya ethidium bromida, yang akan berinterkalasi dengan DNA dan akan muncul sebagai pita berwarna putih di bawah sinar UV (Franks,1999).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di *Institute Human Virus and Cancer Biology*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Salemba, Jakarta Pusat. Penelitian dilakukan dari bulan Januari 2010 sampai Mei 2010.

3.2. PERIJINAN DARI KOMISI ETIK

Persetujuan etis telah diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

3.3. BAHAN

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid) [Invitrogen, USA], FBS (*Fetal Bovine Serum*) [Invitrogen, USA], Penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) [Sigma, USA], gentamisin [Invitrogen, USA], natrium bikarbonat 7,5 % [Invitrogen, USA], PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA (2,5 g porcine trypsin dan 0,2 g EDTA dalam HBSS) [Sigma, USA], trypan blue [Sigma, USA], RNeasy Mini Kit [Qiagen, Jerman], β -mercaptoetanol, OneStep RT-PCR [Qiagen, Jerman], MgCl [Qiagen, Jerman], RNase inhibitor [Invitrogen, USA], primer SOX2 [Eurogentec, Singapore], primer c-Myc [Eurogentec, Singapore], primer PUM1 [1st Base, Indonesia], akrilamid [Promega, USA], bisakrilamid [Promega, USA], tris base [Promega, USA], asam borat [Promega, USA], EDTA [Promega, USA], ammonium persulfate [Promega, USA], TEMED (N,N,N',N' Tetrametiletilenediamin) [Biorad, USA], 6x *Loading Dye* [Vivantis, Malaysia], etidium bromida [Promega, USA], marker DNA 2 Log [New England Biolabs, UK], marker DNA 100 bp [New England Biolabs, UK].

3.4. ALAT

Peralatan yang digunakan selama penelitian antara lain vortex mixer, mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], spektrofotometer NanoDrop ND1000 [Thermo Scientific, USA], sentrifus [TOMY Digital Biology, Jepang], *deep freezer* -80°C [New Brunswick Scientific, UK], timbangan analitik [Adventurer],

mikropipet [Gilson, USA], lemari berpendingin [Sanyo, Jepang], *hemocytometer* [Assistent, Jerman], PCR Thermal Cycler PTC-200™ Programmable Thermal Controller [MJ Research, USA], alat elektroforesis [Biorad, USA], wadah kultur [Biolab, Australia], tip pipet [Axygen, USA], *conical tube* 50 ml, 15 ml dan 10 ml [BD Biosciences, USA], pipet volume [Costar, USA], tube 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml [Axygen, USA], inkubator [Barnstead Lab Line, USA], *Biosafety Cabinet* (BSC) [Esco, China], kamera digital [Sony, Jepang], mikroskop [Olympus, USA], UV transilluminator [Biorad, USA], *freezer* [Vestfrost, Denmark], autoklaf [Hirayama, Jepang], *ice maker* [Hirayama, Jepang] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

3.5. CARA KERJA

3.5.1. Pembuatan Medium (Dulbecco & Freeman, 1959)

Serbuk medium dilarutkan dalam akuabides hingga volume akhir mencapai satu liter. Larutan medium disterilisasi dengan menggunakan penyaring vakum kemudian dibagi ke dalam beberapa bagian masing masing sebanyak 40 ml dan ditempatkan dalam *conical tube* 50 ml. Kedalam masing masing bagian dimasukan HEPES sebanyak 1250 µl, 5 ml *Fetal Bovine Serum*, 250 µl gentamisin, 500 µl Penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) dan 500 µl natrium bikarbonat. Setelah itu dihomogankan dengan cara membolak-balik *conical tube*, kemudian disaring dengan *cell strainer* 0,20 µm. Medium yang sudah disaring lalu dimasukan secara aseptis ke dalam *flask* 25 ml sebanyak 6 ml. *Flask* yang sudah berisi medium kemudian disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan.

3.5.2. Penggantian Medium

Kultur stok sel kanker dan sel normal perlu diganti mediumnya jika medium sudah berubah warna dari merah kekuningan menjadi orange kekuningan. Penggantian medium ini biasanya dilakukan setiap 3 kali seminggu. Kultur stok dikeluarkan dari inkubator dan diletakan dengan hati-hati pada wadah tertutup yang sebelumnya telah disemprot dengan alkohol 70%. Kemudian keluarkan kultur stok dari wadah tertutup ke BSC yang telah disiapkan. Masing-masing kultur sel kemudian dicek dengan mikroskop untuk memastikan bahwa sel sudah menempel pada *flask*. Setelah itu medium dibuang dengan menggunakan

pipet dan diisi dengan medium baru sebanyak 6 ml. Lakukan pada semua kultur sel. Setelah itu masukan kembali kultur stok pada wadah tertutup, yang telah disemprot alkohol 70%, untuk dikembalikan ke inkubator.

3.5.3. Ekstraksi Total RNA (RNeasy Mini Handbook, 2006)

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan *RNeasy Mini Kit* [Qiagen, Jerman]. Prosedur yang digunakan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh produsen. Isolat sel kanker dan sel normal yang akan diekstraksi, sebelumnya dikultur pada 6 ml medium cair DME, kemudian diinkubasi pada suhu 4°C. Sebelum diekstraksi, sel terlebih dahulu difoto pertumbuhannya. Setelah itu, sel dipanen dengan membuang medium DME, sel dicuci dengan PBS dan ditambahkan 1 ml tripsin dalam 9 mL PBS. Tunggu selama 15-20 menit hingga sel lepas dari *flask*. Cuci sel dengan medium DME (untuk menginaktivasi tripsin) sebanyak 2 kali masing-masing dengan 5 ml DME lalu dipindahkan ke *conical tube* dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan medium ini kemudian dipipet sebanyak 2 µl kemudian dicampur dengan 2 µl campuran trypan blue dan PBS. Campuran tersebut dihomogenkan dengan pemipetan dan dimasukkan ke dalam *hemocytometer*. Sel kemudian dihitung dengan bantuan mikroskop. Larutan medium yang sudah dihitung jumlahnya kemudian disentrifus dengan sentrifus berpendingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatan dibuang dan pelet sel dicuci kembali dengan PBS sebanyak 5 mL dan disentrifus dengan sentrifus berpendingin pada suhu 4°C dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang untuk mendapatkan pelet sel.

Langkah selanjutnya adalah melakukan ekstraksi total RNA. Sel yang dipanen ditambahkan dapar RLT sebanyak 350 µl dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan tersebut dipindahkan ke *QIAshredder Spin Column* yang ditempatkan pada tube 1 ml dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 10000 rpm suhu 4°C selama 2 menit. Kemudian ditambahkan satu bagian etanol 70% dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam *RNeasy Spin Column* dan ditempatkan pada tube 1 ml, ditutup dengan baik kemudian disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 10000 rpm dan suhu 4°C selama 15 detik. *RNeasy Spin Column* dilepaskan dari tube 1 ml dan cairan dibuang dari tube tersebut dan dipasang

kembali pada tube 1 ml yang telah dibuang cairan di dalamnya, lalu ditambahkan dapar RW1 sebanyak 700 μ l, ditutup penutup dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik.

RNeasy Spin Column dilepaskan dari tube 1 ml dan cairan dibuang dari tube tersebut dan dipasang kembali pada tube 1 ml yang telah dibuang cairan didalamnya, ditambahkan dapar RPE sebanyak 500 μ l, ditutup penutupnya dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. *RNeasy Spin Column* dilepaskan dari tube 1 ml dan dibuang cairan di dalam tube tersebut dan dipasang kembali pada tube 2 ml yang telah dibuang cairan didalamnya dan ditambahkan dapar RPE sebanyak 500 μ l, ditutup penutup dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 2 menit.

RNeasy Spin Column dilepaskan dan dibuang tube 1 ml beserta cairan didalamnya dan dipasang pada tube 1 ml yang baru, ditutup penutup dengan baik dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 10000 x g dan suhu 4°C selama 1 menit. *RNeasy Spin Column* dilepaskan dan dibuang tube 1 mL beserta cairan di dalamnya dan dipasang pada tube 1 mL yang baru dan ditambahkan air bebas RNase sebanyak 30-50 μ L dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 10000 x g dan suhu 4°C selama 1 menit untuk melarutkan RNA. Ulangi proses ini hingga didapat konsentrasi total RNA yang lebih banyak. Buang *RNeasy Spin Column* dan aliquot RNA ke dalam tube 0,5 ml masing masing sebanyak 5 μ l kemudian simpan cairan RNA pada *deep freezer* dengan suhu -80°C.

3.5.4. Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop (Ausubel, 2001, NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual., 2008)

Untuk menganalisa kemurnian total RNA yang telah diekstraksi, digunakan spektrofotometri NanoDrop ND-1000. Sebelum digunakan sebaiknya permukaan optik bagian atas dan bawah dibersihkan dahulu dengan Kimwipe yang telah dibasahi dengan aquabidest. Software NanoDrop dibuka dan dipilih module "Nucleic Acid" lalu dilakukan inialisasi dengan menempatkan 1 μ l air bebas nuklease pada permukaan optik bagian bawah, diturunkan lengan dan diklik "Initialize" pada software NanoDrop. Setelah selesai, dibersihkan permukaan optik bagian atas dan bawah dengan Kimwipes®. Selanjutnya, dilakukan *blank*

measurement dengan menempatkan 1 µl air bebas nuklease, ditutup lengan dan diklik “Blank” pada software NanoDrop. Setelah selesai dibersihkan kembali permukaan optik dengan Kimwipes®. Setelah selesai, ditempatkan kembali 1 µl sampel RNA pada permukaan optik bagian bawah, ditutup lengan dan diklik “Measure”. Setelah selesai, dibersihkan kedua permukaan optik dengan Kimwipes® dan re-blank dengan 1 µl air bebas nuklease. Pada pengukuran sampel RNA, perhatikan nilai 260/280. Nilai ini harus menunjukkan 1,8-2,1 untuk menentukan bahwa RNA telah murni.

3.5.5. Persiapan RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook, 2008)

Persiapan RT-PCR ini menggunakan *Qiagen OneStep RT-PCR* [Qiagen]. Ke dalam mikro tube 0,5 ml ditambahkan masing masing 2 µl 5x *Qiagen OneStep RT-PCR buffer*, 2 µl *Q- solution*, 0,4 µl dNTP mix 10 mM, 0,6 µl Primer Forward 10 mM, 0,6 µl Primer Reverse 10 mM, 0,1 µl RNase inhibitor, 0,4 µl *Enzyme Mix*, 0,25 µl MgCl, 1,65 µl air bebas nuklease dan 2 µl RNA cetakan (RNA cetakan yang digunakan adalah RNA sampel dan RNA standar) yang sudah disamakan konsentrasinya. Volume akhir 10,0 µl (Tabel 3.1). Untuk kontrol negatif, tidak ditambahkan RNA cetakan dan air bebas nuklease yang ditambahkan 3,65 µl sehingga volume akhirnya 10,0 µl. Persiapan RT-PCR ini harus dilakukan dalam es untuk menjaga agar enzim tidak bekerja sebelum dimasukkan kedalam mesin PCR.

Sekuens primer untuk gen penyandi sel punca adalah sebagai berikut: SOX2 (FWD 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3'; REV 5'-CATGGA GTTGTACTGCAGG -3'), c-Myc (FWD 5'-TCTCAACGACAGCAGCTC-3'; REV 5'-AAGGTGATCCAGACTCTGAC-3') dan PUM1 (FWD 5'- TGAGGT GTGCACCATGAAC-3'; REV 5'- CAGAATGTGCTTGCCATAGG-3'). Keterangan lebih lanjut tentang primer tersebut dapat dilihat pada tabel 3.2.

Cetakan RNA yang akan digunakan untuk proses RT-PCR sebelumnya harus disamakan konsentrasinya. Penyeragaman ini dilakukan hingga konsentrasi cetakan RNA mencapai 1,74 ng/µl. Penyeragaman ini dilakukan untuk cetakan RNA yang berasal dari CS14 normal dan CS14 kanker. Setelah dilakukan penyeragaman ditambahkan 1 µl RNA inhibitor untuk 20 µl total RNA yang telah diencerkan.

Untuk mendapatkan kondisi optimum, dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk masing masing primer. Optimasi dilakukan dengan menggunakan metode gradien PCR dimana pada PCR tersebut suhu perlekatan dari masing masing primer yang ingin dioptimasi diatur sedemikian rupa hingga meningkat secara gradien dari suhu terendah hingga suhu tertinggi yang telah ditentukan sebelumnya. Setelah itu hasil PCR tersebut dirunning pada gel akrilamid dan diamati ketebalan pita yang terjadi. Suhu dimana pita memberikan satu pita spesifik dan intensitas tertinggi adalah suhu perlekatan optimum dari primer tersebut.

3.5.6. Proses RT-PCR

Kondisi RT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum. Dasar pemilihan berdasarkan pada protokol standar (Ausubel, 2001).

1. Untuk gen SOX2

- a. *Reverse Transcriptase* : 50°C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95°C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali : Tahap denaturasi : 94°C; 30 detik
: Tahap pelekatan : 59,3°C; 1 menit
: Tahap perpanjangan : 72°C; 1 menit
- d. Pasca-siklus : Pasca perpanjangan : 72°C; 10 menit
: Penyimpanan : 4°C; selamanya

2. Untuk gen C-Myc

- a. *Reverse Transcriptase* : 50°C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95°C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali : Tahap denaturasi : 95°C; 30 detik
: Tahap pelekatan : 59,3°C; 1 menit
: Tahap perpanjangan : 72°C; 1 menit
- d. Pasca-siklus : Pasca perpanjangan : 72°C; 10 menit
: Penyimpanan : 4°C; selamanya

3. Untuk gen PUM1

- a. *Reverse Transcriptase* : 50°C; 30 menit

- b. Pra-siklus : 95⁰C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali : Tahap denaturasi : 95⁰C; detik
: Tahap pelekatan : 57,3⁰C; 1 menit
: Tahap perpanjangan : 72⁰C; 1 menit
- d. Pasca-siklus : Pasca perpanjangan : 72⁰C; 10 menit
: Penyimpanan : 4⁰C; selamanya

3.5.7. Analisis Amplikon dengan Elektroforesis Gel Akrilamid (Ausubel, 2001, Sambrook, 1989)

Akrilamid dibuat dengan konsentrasi 8%, yaitu dengan membuat campuran yang terdiri dari 3,3 ml air *Milipore*, 0,375 ml dapar TBE 10 x, 1 ml larutan akrilamid, 42,5 µl 10% ammonium persulfat dan 4,25 µl TEMED. Larutan tersebut dihomogenkan dengan pemipetan sebanyak 4x dan dengan cepat dituang ke dalam cetakan gel, sisir dipasang, lalu didiamkan hingga membeku selama 15-20 menit. Setelah membeku, sisir diangkat dan cetakan dipindahkan ke wadah elektroforesis. Wadah tersebut lalu diberi dapar TBE hingga menggenangi permukaan gel akrilamid. Ada beberapa hal penting yang perlu diperhatikan dalam proses pembuatan gel akrilamid ini yaitu setelah penambahan TEMED sebaiknya proses pengerjaan selanjutnya dilakukan dengan cepat untuk menghindari polimerisasi akrilamid yang terlalu dini dan pada saat pemasangan sisir sebaiknya dihindari adanya gelembung udara agar terbentuk sumur yang baik dan homogen.

Sebanyak 4 µl larutan hasil RT-PCR ditambahkan dengan 2 µl *loading dye* diatas kertas parafilm. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel yang tersedia dengan hati-hati. Elektroforesis dinyalakan dan kondisi diatur dengan tegangan sebesar 110 volt dan arus listrik 400 A. Kemudian alat dijalankan selama 50 menit.

Setelah selesai dijalankan, gel akrilamid diambil dan direndam selama 1 menit dalam larutan etidium bromida yang telah diencerkan dengan TBE 1x. Pita ampikon diamati melalui UV transilluminator pada panjang gelombang 590 nm dengan pelindung (*hood*) dan hasilnya difoto. Foto gel dilakukan dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer sehingga dapat diedit dan dicetak.

3.5.8. Pengukuran Intensitas dengan Software GelDoc Quantity One (Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh, 2006)

Pengukuran intensitas dilakukan dengan menggunakan software GelDoc. Software ini dapat mengukur intensitas ampikon yang didapat setelah gel yang telah direndam etidium bromida selama 1 menit diletakan pada lapisan kaca pada UV transiluminator dan difoto oleh kamera yang terhubung dengan UV transiluminator dan divisualisasikan oleh layar komputer.

Setelah selesai dielektroforesis, secara hati hati gel akrilamid dilepaskan dari cetakan, dipindahkan ke larutan etidium bromida yang telah diencerkan dengan dapar TBE 1x dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, gel secara hati-hati diletakkan dalam lapisan kaca dalam UV transiluminator. Lalu dibuka software Quantity One, diklik "File" lalu dipilih GelDoc XR kemudian akan muncul layar akuisisi. Pada layar akuisisi kemudian dipilih tombol "Live/Focus" dan diklik "Manual Acquire" dan diatur Exposure Time hingga didapat gambar yang sesuai. Lalu diklik "Freeze" dan "Save" pada folder yang telah disiapkan sebelumnya.

Gambar yang telah disimpan tersebut kemudian dibuat garis sesuai dengan jumlah sumur yang digunakan. Caranya dengan mengklik band "Lanes", diklik "Frame Lanes" kemudian diketik jumlah sumur yang digunakan. Maka akan terbentuk garis vertikal pada masing masing sumuran. Setelah itu dipilih menu "Band", diklik "Detect Band" maka akan muncul layar baru lalu pada kotak parameter diklik "Load" dan dipilih parameter yang telah diset kemudian diklik "Detect" lalu akan muncul garis pada pita ampikon. Lalu dipilih menu "Report" dan diklik "All Lanes Report", dipilih parameter yang ingin ditampilkan dan diklik "Report". Kemudian akan muncul layar report dan diklik gambar save, dipilih format excel, diberi nama, dipilih folder yang diinginkan dan diklik "Save".

3.5.9. Uji Linearitas

Uji linearitas bertujuan untuk menentukan jumlah mRNA gen SOX2, c-Myc dan PUM1 yang diamplifikasi dalam proses RT-PCR. Uji linearitas dilakukan dengan melakukan RT-PCR dan RNA cetakan yang digunakan telah diencerkan dengan pengenceran 1/2, 1/4, 1/8, dan 1/16. Selain menggunakan cetakan RNA yang telah diencerkan, RT-PCR juga dilakukan dengan RNA

cetakan yang belum diencerkan. Hasil amplikon yang dianalisis dengan gel akrilamid kemudian diukur intensitasnya dan hasil pengukuran intensitas digambarkan dalam bentuk kurva untuk menentukan nilai r^2 dari hasil amplikon dari masing-masing gen.

3.5.10. Pengukuran Level RNA gen SOX2, c-Myc dan PUM1 pada CS 14

Pengukuran level RNA untuk gen SOX2, c-Myc dan PUM1 pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker dilakukan duplo untuk masing masing sampel. RNA cetakan yang digunakan berasal dari hasil ekstraksi CS14 normal dan CS14 kanker yang sudah disamakan konsentrasinya dan diencerkan empat kali. Hasil pengukuran intensitas amplikon untuk gen target yaitu gen SOX2 dan c-Myc kemudian diplot dalam kurva linearitas untuk mengetahui jumlah mRNA yang diamplifikasi. Hasil pengukuran amplikon gen SOX2 dan c-Myc kemudian dibandingkan dengan hasil pengukuran intensitas gen PUM1 untuk mendapatkan suatu nilai ratio tertentu. Nilai ratio yang didapatkan menggambarkan level ekspresi gen SOX2 dan c-Myc yang kemudian nilai ratio ini dapat dibandingkan dengan CS14 normal dan CS14 kanker untuk melihat peningkatan level ekspresi gen SOX2 dan c-Myc pada sampel sel normal dan sel kanker.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Medium

Pada penelitian ini medium yang digunakan untuk kultur sel adalah DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*). Serbuk medium kemudian dilarutkan hingga homogen dengan aquabidest steril hingga volumenya mencapai satu liter. Larutan medium disterilisasi dengan penyaringan dan hasil penyaringan kemudian dialiqout ke dalam *conical tube* 50 ml masing masing sebanyak 40 ml. *Conical tube* yang berisi larutan medium kemudian disimpan dalam freezer dengan suhu -20°C .

4.2. Penggantian Medium

Pada proses penggantian medium, *conical tube* yang berisi larutan medium dikeluarkan dari *freezer* dan didiamkan hingga larutan medium mencair. Setelah mencair, ditambahkan dalam medium 1250 ul HEPES, 5 ml FBS (*Fetal Bovine Serum*) untuk melekatkan sel ke dasar flask, 500 ul natrium bikarbonat untuk menjaga pH, 500 ul Penstrep dan 250 ul gentamisin untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Larutan medium yang sudah dicampur dengan bahan tersebut kemudian dihomogenkan dengan cara membolak-balikan *conical tube* dan disterilisasi dengan penyaringan sebelum digunakan. Penggantian medium dilakukan dengan membuang 5 ml larutan medium yang berada dalam flask dengan menggunakan pipet volume. Kemudian sebanyak 5 ml larutan medium yang baru dipipet dan dimasukkan ke dalam flask tersebut. Hal ini dilakukan setiap tiga kali sehari agar pertumbuhan sel tetap terjaga dengan baik.

4.3. Ekstraksi Total RNA dan Analisis Kualitas Kemurnian Total RNA

Sampel yang digunakan untuk ekstraksi total RNA merupakan sel kanker payudara dan sel normal payudara yang diambil dari jaringan payudara yang sama. Sampel diambil dalam waktu kurang lebih satu jam setelah operasi pengangkatan tumor dan disimpan dalam keadaan dingin (2°C - 5°C) untuk kemudian diproses di laboratorium.

Sampel mengalami beberapa proses sebelum dapat digunakan untuk proses ekstraksi RNA. Sampel yang kemudian dilakukan isolasi jaringan yaitu

didisosiasi, dicuci dengan PBS dan medium DME, dipisahkan dari sel lemak, dipotong menjadi bagian yang lebih kecil kemudian dikultur pada flask yang berisi 5 ml medium DMEM. Isolasi jaringan payudara hingga dapat dikultur dilakukan oleh tim IHVCB-UI. Kultur kemudian disimpan pada inkubator yang dialiri 5% gas CO₂ dan dilengkapi dengan lampu UV. Pertumbuhan kultur tersebut dipantau setiap tiga kali seminggu untuk memastikan apakah sel tumbuh dengan baik. Jika sel tumbuh dengan baik, maka dilakukan proses selanjutnya yaitu pewarnaan imunohistokimia untuk melihat adanya marker sel punca kanker payudara yaitu CD44⁺ dan CD24⁻.

Uji pendahuluan dengan metode imunohistokimia (Kurnia, 2010) menemukan bahwa sampel CS14 kanker memiliki marker sel punca kanker payudara pada permukaan selnya. Oleh karena itu, pada penelitian kali ini sampel yang akan dilihat ekspresi gen SOX2 dan c-Myc adalah sampel CS14 kanker. Sedangkan untuk optimasi dipilih CS8 normal karena pertumbuhannya sangat baik sehingga dapat diperoleh konsentrasi RNA yang cukup untuk melakukan optimasi.

Reagen untuk mengekstraksi RNA menggunakan RNeasy Mini Kit [Qiagen, Jerman] yang terdiri dari bahan – bahan sebagai berikut : dapar RLT yang mengandung *guanidine thiocyanate* 25-50% dan ditambahkan β-mercaptoetanol 10 ul dalam 1 ml dapar RLT ; dapar RW1 yang mengandung *guanidine thiocyanate* 2,5 - 10% ; dapar RPE diencerkan dengan etanol 96-100% ; air bebas RNase.

Sel yang telah tumbuh dengan baik kemudian difoto pertumbuhan selnya (Gambar 4.1) sebelum dihitung jumlah selnya dengan menggunakan kamar hitung dan mikroskop (Gambar 4.2). Kultur sel tersebut dibuang mediumnya secara seksama dengan menggunakan pipet, dicuci dengan PBS sebanyak dua kali kemudian sel ditambahkan larutan tripsin dan didiamkan selama 5-10 menit hingga sel terlepas dari dasar wadah kultur. Pencucian dengan PBS dilakukan sebanyak dua kali untuk memastikan bahwa tidak ada medium yang tertinggal karena adanya medium akan menghambat kerja dari tripsin dalam melepaskan sel dari dasar wadah kultur.

Setelah memastikan bahwa sel sudah terlepas dari dasar wadah kultur, larutan tripsin yang mengandung sel tersebut kemudian disentrifus dengan menggunakan sentrifus (Gambar 4.3) pada kecepatan 900 rpm selama 10 menit.

Setelah selesai disentrifus supernatan dibuang dan ditambahkan 5 ml medium pada pelet sel dan dihomogenkan dengan pemipetan. Setelah dihomogenkan, ambil 2 ul larutan medium yang mengandung sel dan dicampur dengan 2 ul campuran 90 ul *trypan blue* dengan 10 ul PBS. Sebanyak 4 ul campuran tersebut kemudian dimasukkan kedalam kamar hitung dan dihitung dengan bantuan mikroskop. Hasil perhitungan sel kemudian dimasukkan kedalam rumus:

$$\frac{\text{Jumlah sel}}{\text{ml}} = \frac{\text{jumlah sel hasil perhitungan}}{4} \times \text{faktor pengenceran} \times 10000$$

Dimana faktor pengenceran = 2

Setelah didapatkan jumlah sel pada tiap sampel lalu dilakukan penyeragaman jumlah sel pada tiap sampel menjadi 5×10^4 untuk kemudian dilakukan ekstraksi total RNA. Penyeragaman jumlah sel sebelum diekstraksi dilakukan sebagai langkah awal dalam menormalisasi RNA.

Sel yang sudah disamakan jumlahnya kemudian disentrifus dan dibuang supernatnya untuk mendapatkan pelet sel. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan kit dari Qiagen (RNeasy Mini Handbook, 2006). Kemudian ditambahkan buffer RLT -yang sebelumnya telah ditambahkan β -mercaptoetanol- ke pelet sel tersebut. Buffer RLT mengandung garam guanidium tiosianat yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein yang merupakan komponen penyusun membran sel dengan merangsang transfer group non polar ke dalam air sehingga akan meningkatkan sifat lipofilisitasnya. Sedangkan dengan adanya β -mercaptoetanol yang merupakan agen pereduksi yang efektif dalam menghambat kerja dari RNase –suatu enzim yang mendegradasi RNA, dapat bekerja dalam konsentrasi rendah dan sangat stabil- dengan cara mereduksi ikatan disulfide sehingga akan merusak konformasi enzim RNase dan menjaga keutuhan total RNA (RNeasy Mini Handbook, 2006).

Setelah ditambahkan buffer RLT, dihomogenkan dengan cara divortex selama 1 menit sehingga tidak akan menyebabkan penyumbatan pada proses selanjutnya. Suspensi yang sudah homogen lalu dilewatkan pada spin kolom Qiashadder dan sentrifus dengan mikrosentrifus (Gambar 4.4) kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Kemudian tambahkan 350 ul etanol 70 % ke dalam kolom

dan homogenkan dengan *pipeting* hingga seluruh larutan etanol tersaring ke dalam tube. Penambahan etanol ini bertujuan untuk mengendapkan materi asam nukleat dan menghilangkan kontaminasi protein. Kemudian sebanyak 700 ul larutan yang terdapat dalam tube kemudian disaring dengan menggunakan kolom spin RNeasy yang telah ditempatkan pada tube yang baru dan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Buang larutan yang berada di tube. Kemudian cuci dengan 700 ul buffer RW1 yang mengandung guanidine tiosianat dan etanol agar pemecahan sel dan pengendapan materi asam nukleat berlangsung lebih efektif. Setelah dicuci, disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Kemudian dicuci dengan 500 ul buffer RPE untuk mencuci membran spin kolom kemudian di sentifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Ulangi langkah ini kemudian disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Lalu tube diganti dengan yang baru, kemudian lakukan lagi sentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan membrane dari etanol karena adanya etanol dapat menghambat reaksi RT-PCR. Kemudian buang tube bersama dengan cairan didalamnya yang mengandung etanol.

Larutkan RNA yang berada di membran spin kolom dengan 40 ul RNase free water dan sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Larutan yang berada dalam tube adalah larutan RNA yang kemudian dialiqout ke dalam tube PCR masing-masing 20 ul dan disimpan dalam *deep freezer* -80° C untuk menjaga kualitas RNA.

4.4. Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

Uji selanjutnya adalah melakukan uji kemurnian terhadap total RNA yang sudah diekstraksi dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop (Gambar 4.5). Sampel yang diuji kemurniannya adalah sampel CS8 normal yang digunakan untuk optimasi, CS14 normal dan CS14 kanker yang akan dianalisis ekspresi SOX2 dan c-Myc. Sebelum diukur total RNA hasil ekstraksi diencerkan dengan buffer TE steril (1:1 v/v). Pengenceran dengan buffer ini berguna agar menjaga pH dalam range 7,5-8,5 karena jika pH diluar dari range tersebut dapat mempengaruhi nilai ratio A260/280 (Wilfinger et al, 1997). Sebanyak 2 ul campuran tersebut dipipet ke atas lapisan fiber optik dan diukur pada panjang gelombang 260 nm. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer Nanodrop, didapatkan konsentrasi total RNA untuk CS8 normal, CS14 normal dan CS14

kanker berturut-turut adalah 74 ng/ul, 2,48 ng/ul dan 3,68 ng/ul dengan nilai A260/280 untuk CS8 normal, CS14 normal dan CS14 kanker adalah 1,8, 1,8 dan 1,94. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa konsentrasi CS14 normal dan CS14 kanker jauh lebih sedikit dibanding CS8 normal dikarenakan jumlah sel CS14 normal dan CS14 kanker sebelum diekstraksi jauh lebih sedikit dari CS8 normal dimana jumlah sel CS14 normal dan CS14 kanker hanya 5×10^4 sel/ml sedangkan jumlah sel CS8 normal sebesar $2,5 \times 10^6$ sel/ml. Nilai A260/280 untuk sampel CS8 normal, CS14 normal dan CS14 kanker masih berada dalam range 1,8-2,1 yang mengindikasikan bahwa total RNA hasil ekstraksi sudah cukup murni dari kontaminasi protein.

4.5. Optimasi RT-PCR

Proses selanjutnya adalah RT-PCR (Gambar 4.6) untuk mengamplifikasi gen target SOX2 dan c-Myc dan *housekeeping genes* PUM1 dengan menggunakan primer spesifik untuk masing-masing gen. Pada penelitian kali ini RT-PCR dilakukan dengan satu langkah (*one step*) dimana proses *reverse transcription* dan proses PCR dilakukan dalam satu proses. Berbeda dengan RT-PCR dengan dua langkah (*two steps*) dimana sintesis cDNA dari total RNA dan amplifikasi cDNA dengan proses PCR terjadi dalam dua tube (*two tubes*), RT-PCR dengan satu langkah kedua proses tersebut dilakukan dalam satu tube (*one tube*). Penggunaan *one step* RT-PCR ini dipilih untuk mengurangi langkah kerja sehingga akan meningkatkan efisiensi dan efektifitas karena makin sedikit langkah kerja yang dilakukan akan semakin mengurangi kesalahan yang mungkin dilakukan (Bustin & Nolan, 2004).

Reagen untuk *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) menggunakan OneStep RT-PCR [Qiagen, Jerman] yang terdiri dari bahan-bahan sebagai berikut : campuran enzim Omniscript, Sensiscript dan HotStarTaq DNA *Polymerase* dalam dapar pH 9 yang berisi 20 mM Tris-Cl, 100 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,1 mM EDTA, 0,5% (v/v) Nonidet P-40, 0,5% (v/v) Tween 20, 50% gliserol ; dapar 5x pH 8,7 yang mengandung Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12,5 mM MgCl_2 , dan DTT ; Q-solution yang berfungsi sebagai PCR *enhancer* ; campuran dNTP yang berisi dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP dengan konsentrasi masing-masing 10 mM ; air bebas RNase.

Omniscript yang terdapat dalam campuran enzim untuk proses RT-PCR adalah enzim *reverse transcriptase* yang dapat didesain untuk reverse transcription dengan konsentrasi RNA cetakan lebih dari 50 ng sedangkan Sensiscript adalah enzim *reverse transcriptase* yang dirancang untuk konsentrasi yang lebih kecil dari 50 ng. *HotstarTaq Polymerase* adalah enzim DNA polimerase yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus* yang bekerja pada suhu 95°C dimana pada suhu tersebut enzim *reverse transcriptase* menjadi inaktif.

Pada reaksi *reverse transcription* digunakan enzim *reverse transcriptase* yaitu suatu enzim yang dapat mensintesis cDNA dengan RNA cetakan (Fairell, 2005). Primer yang digunakan adalah primer *reverse* yang akan melekat pada ujung 3' rantai tunggal RNA. Lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit agar enzim *reverse transcriptase* dapat mensintesis cDNA. Kemudian masuk pada ke proses PCR dimana akan dilakukan proses prasiklus dengan suhu 95°C selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik kemudian dilanjutkan dengan proses pelekatannya yang berlangsung selama 1 menit dengan suhu berbeda-beda untuk tiap gen karena tiap primer berbeda suhu pelekatannya. Tahap selanjutnya adalah proses perpanjangan dengan suhu 72°C selama 1 menit. Siklus yang digunakan adalah 36 siklus dan diakhiri dengan proses pasca siklus dengan suhu 72°C selama 10 menit.

Hasil RT-PCR kemudian dianalisis menggunakan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) dengan alat cetakan dan elektroforesis dari Biorad (Gambar 4.7) untuk mengetahui besar ampikon. Pada penelitian kami ini, dipilih gel akrilamid dengan konsentrasi 8% karena hasil ampikon yang kami inginkan hanya sebesar 150-250 bp. Gel poliakrimid ini terbentuk dari polimerisasi akrilamid dan *cross-linkingnya* yaitu bisakrilamid dengan ammonium persulfat sebagai inisiator dan TEMED sebagai katalis (Boyer, 2000). setelah gel selesai dibentuk, masukkan kedalam masing sumur campuran homogen 2 µl *loading dye* dengan 4 µl sampel hasil RT-PCR dan pada sumur yang lain juga dimasukkan penanda sebanyak 2 µl. Kemudian alat elektroforesis dijalankan dengan kondisi 110 volt selama 50 menit. Setelah selesai *distaining* dengan direndam dalam ethidium bromide selama 1 menit dan diletakan pada UV transiluminator (Gambar 4.8). Besar pita ampikon kemudian diukur dengan penanda sebagai patokan. Pada penelitian ini digunakan penanda 100 bp (Gambar 4.9) dan 2 log (Gambar 4.10).

Primer yang digunakan untuk *one step* RT-PCR adalah primer spesifik untuk gen SOX2 (Gambar 4.11), c-Myc (Gambar 4.12) dan PUM1 (Gambar 4.13). Primer ini SOX2 dan c-Myc dirancang oleh tim IHVCB- UI dengan menggunakan software Bioedit (Hall, 1999) dan Clustal X (Larkin, 2007) sedangkan untuk sekuens primer PUM1 diperoleh dari jurnal bioteknologi (Szabo, 2004). Ketiga sekuens primer gen tersebut didesain berdasarkan *coding region* mRNA dari masing-masing gen tersebut. *Coding region* adalah area pada mRNA yang terdiri dari susunan nukleotida yang kemudian dapat ditranslasi menjadi polipeptida (Fairell, 2005). Penggunaan primer spesifik ini mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan penggunaan primer random hexamer atau oligo-dT karena primer spesifik dapat meningkatkan efektifitas karena sensitifitasnya yang hanya menempel pada sekuens spesifik dari gen yang ingin analisis (Bustin & Nolan, 2004).

Pada uji pendahuluan PCR, dilakukan optimasi terhadap dua target gen yaitu SOX2 dan c-Myc dan *housekeeping gene* yaitu PUM1. Sampel yang digunakan untuk optimasi ketiga gen ini adalah sampel CS8 normal dan suhu untuk tahap perlekatan digunakan suhu 55°C- 65°C. Hasil pengamatan amplikon gen SOX2 dengan suhu perlekatan 55°C, 57°C dan 59°C pada elektroforesis gel akrilamid 8 % menunjukkan terdapat satu pita spesifik yaitu sekitar 150 bp pada suhu 55°C dan 59°C, sedangkan pada suhu 57°C masih terdapat satu pita spesifik dan satu pita tidak spesifik. Hasil pengukuran intensitas pada ketiga suhu tersebut berturut-turut adalah 3133,268 pixel, 3334,665 pixel dan 3154,837 pixel (Tabel 4.1). Hasil pengukuran intensitas menunjukkan bahwa suhu 57°C adalah suhu yang memberikan intensitas paling besar diantara ketiga suhu tersebut namun karena pada suhu tersebut terdapat satu pita tidak spesifik pada ukuran sekitar 500 bp maka suhu 57°C tidak dapat digunakan sebagai suhu optimasi. Oleh karena itu suhu optimasi untuk gen SOX2 adalah 59°C dimana pada suhu ini memberikan intensitas pita yang cukup kuat dan menunjukkan satu pita spesifik pada ukuran sekitar 150 bp (Gambar 4.14).

Hasil pengamatan amplikon gen c-Myc dengan suhu perlekatan 55°C, 57°C dan 59°C menunjukkan banyak pita tidak spesifik kecuali pada suhu 59°C yang menunjukkan pada satu pita spesifik pada ukuran sekitar 250 bp dan sesuai dengan ukuran pita amplikon yang diharapkan. Hasil pengukuran intensitas pita dengan menggunakan software Quantity One berturut-turut adalah 2167,894

pixel, 2174,277 pixel, dan 2046,640 pixel (Tabel 4.1). Walaupun dari hasil pengukuran intensitas suhu 59°C memberikan intensitas yang paling lemah namun karena pada suhu 59°C menunjukkan satu pita spesifik maka suhu ini dipilih sebagai suhu optimum untuk gen c-Myc (Gambar 4.14).

Sedangkan untuk *housekeeping gene* yaitu PUM1 juga dilakukan optimasi untuk suhu perlekatan yaitu suhu 55°C, 57°C, 59°C, 60°C dan 65°C. pada kelima suhu tersebut menunjukkan satu pita spesifik yaitu pada ukuran sekitar 170 bp. Hasil pengukuran intensitas berturut-turut adalah 1535,503 pixel, 1540,386 pixel, 1456,180 pixel, 1536,578 pixel dan 1083,315 pixel (Tabel 4.1). Dari pengukuran intensitas menunjukkan bahwa suhu 57°C adalah suhu optimum untuk *housekeeping genes* PUM1 karena memberikan pita dengan intensitas paling kuat (Gambar 4.15).

Untuk proses pelekatan, harus dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk mendapatkan suhu optimum masing-masing primer. Pada umumnya suhu perlekatan optimum lebih rendah 5°C dari T_m tiap primer. T_m adalah temperature dimana 50% proses pelekatan antara primer dan cetakan telah berlangsung. Oleh karena itu nilai T_m yang didapat ketika mendesain primer dapat dijadikan patokan dalam menyusun suhu optimum yang tepat untuk proses pelekatan. Untuk SOX2 dimana T_m primernya adalah 64°C, maka disusun suhu optimasinya adalah 55°C, 57°C, dan 59°C dimana dengan hasil pengukuran intensitas didapatkan suhu optimum adalah 59°C. T_m untuk c-Myc adalah 63°C maka suhu untuk optimasinya adalah 55°C, 57°C, dan 59°C dan dari hasil pengukuran didapatkan suhu optimumnya adalah 59°C. sedangkan untuk PUM1, nilai T_m adalah 68°C dan disusun suhu optimumnya 60°C, 63°C dan 65°C, dan karena hasil pita yang didapatkan kurang memuaskan maka optimasi dilakukan kembali dengan suhu yang berbeda yaitu 55°C, 57°C, 59°C, 60°C dan 65°C dan pita yang dihasilkan kembali diukur. Hasil pengukuran intensitas didapatkan bahwa suhu 57°C adalah suhu optimum karena memberikan intensitas paling kuat dibandingkan pita pada suhu yang lain.

4.6. Uji Linearitas RT-PCR

Uji linearitas dilakukan terhadap ketiga gen tersebut yaitu SOX2, c-Myc dan PUM1 dengan menggunakan RNA cetakan CS8 normal dengan konsentrasi 2,68 ng/μl dan diencerkan dengan faktor pengenceran 1/2, 1/4, 1/8 dan 1/16

(setara dengan konsentrasi 1,24 ng/μl, 0,62 ng/μl, 0,31 ng/μl dan 0,155 ng/μl) dengan air bebas RNase yang telah ditambahkan RNase Inhibitor sebanyak 1 μl untuk 10 μl. Penambahan ini bertujuan agar mencegah degradasi RNA oleh enzim RNase.

Uji ini dilakukan untuk mengetahui jumlah mRNA yang dibutuhkan dalam proses RT-PCR. Pengenceran dibuat dengan mengencerkan 1 μl dalam 2 μl air bebas RNase sehingga didapat faktor pengenceran 1/2. Kemudian dari pengenceran 1/2 dipipet 1 μl dan ditambahkan dengan 2 μl air bebas RNase sehingga faktor pengenceran menjadi 1/4. Kemudian dari faktor pengenceran 1/4 diambil 1 μl dan diencerkan dengan 2 μl air bebas sehingga faktor pengenceran terakhir menjadi 1/16.

Ketiga pengenceran RNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan RT-PCR SOX2, c-Myc dan PUM1 dengan suhu pelekatan yang sebelumnya telah dioptimasi. Hasilnya didapatkan bahwa linieritas untuk SOX2 adalah $y = 2228.9x + 2920.4$ dengan $r^2 = 0,9849$ (Gambar 4.16), c-Myc adalah $y = 2012,2x + 2581$ dengan $r^2 = 0,9787$ (Gambar 4.17) dan PUM1 adalah $y = 6087.1x + 690.48$ dengan $r^2 = 0,988$ (Gambar 4.18). Hasil uji linearitas dapat dilihat pada tabel 4.2.

4.7. Analisis Level Ekspresi Gen SOX2 dan c-Myc

Uji yang terakhir adalah RT-PCR dengan sampel CS14 normal dan CS14 kanker yang berdasarkan penelitian oleh Kurnia (2010) diketahui bahwa sampel CS14 kanker positif memiliki populasi sel punca berdasarkan pewarnaan pada marker CD44⁺ dan CD24⁻ di permukaan sel. Uji ini dilakukan duplo untuk masing-masing gen dalam sampel CS14 normal dan CS 14 kanker dan RNA cetakan yang digunakan adalah RNA cetakan dengan konsentrasi 1,74 ng/μl. Hasilnya sampel CS14 normal (Gambar 4.19) menunjukkan pengukuran intensitas amplicon SOX2 sebesar 3518,938 pixel dan 3920,125 pixel sedangkan untuk c-Myc adalah 2701,938 pixel dan 2766,938 pixel dan untuk PUM1 tidak terbentuk pita. Pada sampel CS14 kanker menunjukkan pengukuran intensitas amplicon SOX2 sebesar 3983,625 pixel dan 3994,028 pixel sedangkan untuk c-Myc adalah 3516, 327 pixel dan 3573,813 pixel dan PUM1 adalah 2891,567 pixel dan 2889, 509 pixel (Tabel 4.3). Data ini divisualisasikan dalam bentuk kurva (Gambar 4.20)

Tidak terbentuknya pita amplikon pada CS14 normal dikarenakan banyak faktor, salah satunya adalah karena RNA cetakan yang sudah rusak karena kondisi penyimpanan seperti proses *thawing* yang berulang kali dan adanya kontaminasi RNase, dan karena proses pipetasi yang kurang sempurna pada saat mencampurkan bahan-bahan untuk proses RT-PCR (McPherson dan Moller, 2006). Oleh karena itu, sebaiknya RNA hasil ekstraksi harus dialiquot dalam jumlah yang lebih kecil yaitu 5 μ l untuk tiap tube agar menghindari proses *thawing* yang berkali-kali dan meminimalisir kontaminasi RNase. Untuk memastikan apakah RNA masih dalam kondisi baik adalah dengan melakukan analisis RNA dengan elektroforesis *denaturing* agarose (Fairell, 2005). Analisis ini tidak dilakukan karena keterbatasan bahan yang dimiliki.

Hasil pengukuran ketiga gen pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker kemudian diplot pada kurva linearitas yang sudah dikerjakan sebelumnya. Hasil rata-rata pengukuran masing-masing gen pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker dimasukkan ke dalam persamaan garis sehingga didapat jumlah mRNA sampel yang diamplifikasi setara dengan faktor pengenceran mRNA tertentu pada kurva linearitas. Hasilnya menunjukkan bahwa pada sampel CS14 normal jumlah mRNA gen SOX2 yang diamplifikasi setara dengan faktor pengenceran 0,35 (0,868 ng/ μ l), sedangkan c-Myc setara dengan faktor pengenceran 0,076 (0,188 ng/ μ l) dan PUM1 tidak dapat disetarakan karena tidak ada intensitas pita amplikon yang terdeteksi. Pengukuran pada sampel CS14 kanker menunjukkan bahwa jumlah mRNA gen SOX2 yang diamplifikasi setara dengan faktor pengenceran 0,48 (1,1904 ng/ μ l), mRNA c-Myc setara dengan faktor pengenceran 0,48 (1,1904 ng/ μ l) dan mRNA PUM1 setara dengan faktor pengenceran 0,36 (0,8928 ng/ μ l).

Tahap terakhir adalah menormalisasi hasil pengukuran gen SOX2 dan c-Myc pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker dengan menggunakan hasil pengukuran duplo gen PUM1 pada CS14 kanker (PUM1 kanker 1 dan PUM1 kanker 2). Hasil normalisasi dapat dilihat pada tabel 4.4. Hasil normalisasi dengan PUM1 kanker 1 menunjukkan bahwa ekspresi gen SOX2 meningkat 2,22%-13,11% dan gen c-Myc menunjukkan peningkatan sebesar 27,37%-37,7%. Normalisasi dengan PUM1 kanker 2 menunjukkan bahwa ekspresi SOX2 meningkat sebesar 1,47% -13,11% dan c-Myc mengalami peningkatan sebesar

27,37%- 37,77%. Kurva hasil normalisasi untuk SOX2 dan c-Myc dapat dilihat pada Gambar 4.21 dan 4.22.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Temperatur optimum pada proses pelekatan untuk pasangan primer SOX1 adalah 59,3°C, c-Myc adalah 59,3°C dan PUM1 adalah 57,3°C.
2. Level ekspresi SOX2 pada CS14 kanker meningkat sebesar 2,22%-13,11% dan c-Myc sebesar 27,37%- 37,7% jika dibandingkan dengan CS 14 normal.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan denaturing gel elektroforesis sebagai kontrol kualitas untuk mengetahui kondisi RNA cetakan.
2. Perlu dilakukan pengukuran level RNA secara kuantitatif dengan menggunakan Real Time RT-PCR untuk mengetahui ekspresi gen yang lebih akurat.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/132-senam-dan-makanan-sehat-cegah-kanker-sejak-dini.html>. 10 Juni 2010.
- Alberts, B., et al. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (Ed. ke-3). New York: Garland Publishing, Inc.
- Al Hajj, M., et al. (2003). Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983-3988.
- American Cancer Society. (2007). *Cancer Facts and Figure 2007*. Atlanta: American Cancer Society.
- Anonim. (1995). *Application Manual*. Germany: Boehringer Mannheim GmbH Biochemical.
- Anonim. (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual*. Delaware: Thermo Fisher Scientific
- Anonim. (2008). *Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook*. US: Qiagen Group.
- Anonim. (2006). *Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh*. California: Biorad Laboratories, Inc.
- Anonim. (2006). *RNeasy Mini Handbook*. US: Qiagen Group
- Ausubel, F.M. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Beard, J. (1902). Embryological Aspects and Etiology of Carcinoma. *Lancet*. 1, 1758-1761.
- Blanchard, M.M., et al. (1993). PCR Buffer Optimization with Uniform Temperature Regimen to Facilitate Automation. *PCR Methods Appl.* 2, 234-240.

- Boyer, R. (2000). *Modern Experimental Biochemistry* (Ed. ke-3). California: Addison Wesley Longman, Inc.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169-193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problem. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23-39.
- Bustin, S.A. dan Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantification Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. Biomol. Techniques.* 15, 3, 155-166
- Centers for Disease Control and Prevention. (2001). *How to Collect High Quality Cancer Surveillance Data.*
- Comtesse, N., et al. (2005). Complex Humoral Immune Response Against a Benign Tumor: Frequent Antibody Response Against Specific Antigens as Diagnostic Targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9601–9606.
- Dong, C., Wilhelm, D., dan Koopman, P. (2004). SOX Genes and Cancer. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 2, 442-447.
- Dulbecco, R. dan Freeman, G. (1959). Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology.* 8, 396.
- Erlich, H.A. (1989). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification.* England: Macmillan Publishers Ltd.
- Fairell, R.E. (2005). *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization.* New York: Elsevier Academic Press.

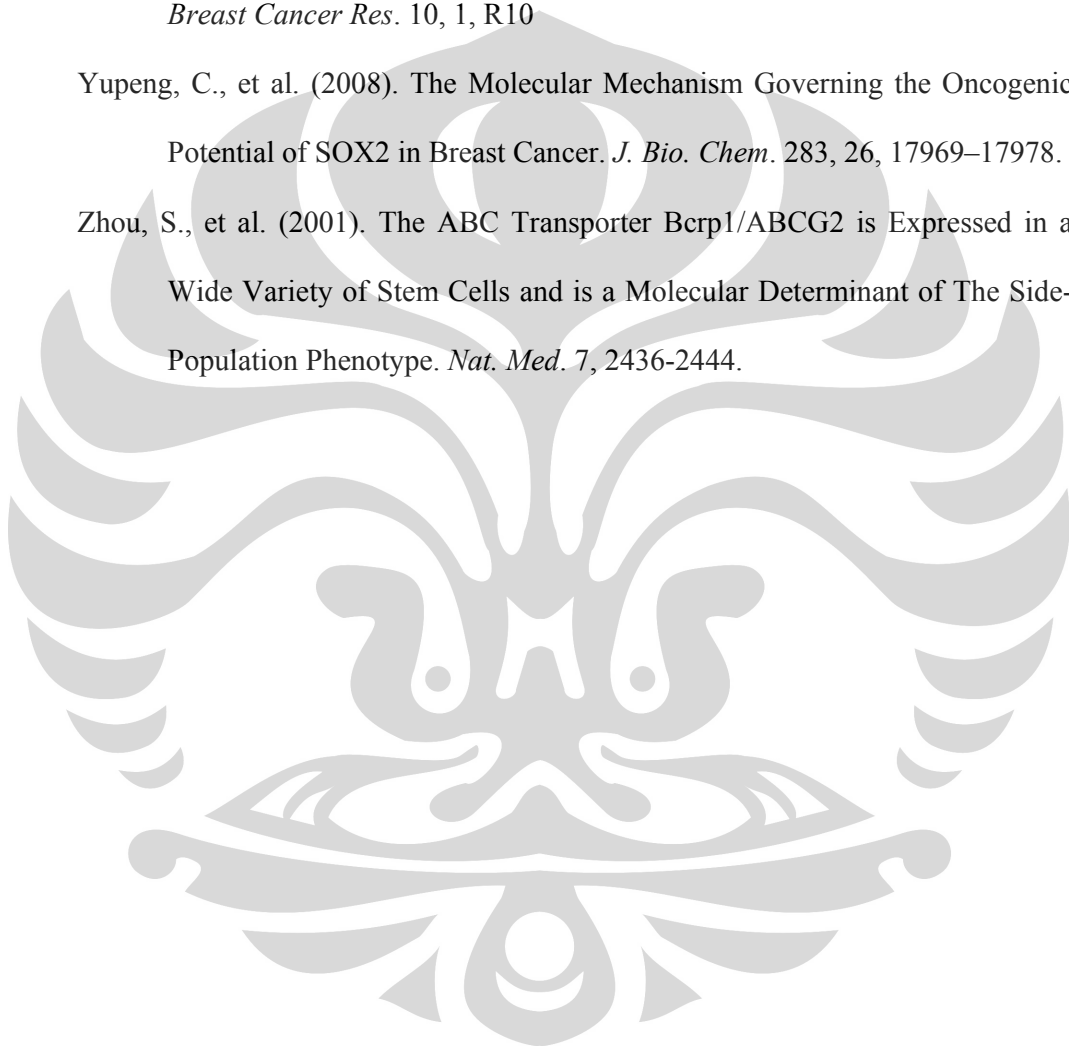
- Ferlay, J., et al. (2002). *Globocan 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Version 2.0*. Lyon: IARC Press.
- Fillmore, C. dan Kuperwasser, C. (2007). Human Breast Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD24: Enriching for Cells With Functional Properties in Mice or in Man. *Breast Cancer Res.* 9, 3, 303.
- Franks, F. (1993). *Protein Biotechnology*. US: The Humana Press Inc.
- Gale, T. (2005). Housekeeping Genes. *Dalam: Gale, Thomas. World of Genetics*. US: Thomas Corporation.
- Gardner, L., Lee, L., dan Dang, C. (2002). *The c-Myc Oncogenic Transcription Factor taken from The Encyclopedia of Cancer* (Ed. ke-2). US: American Press.
- Gilbert, S.F. (2006). *Developmental Biology* (Ed. ke-8). US: Sinauer Association, Inc.
- Ginestier, C. (2007). ALDH1 is a Marker of Normal and Malignant Breast Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell.* 555-567.
- Gure, A.O., et al. (2000). Serological Identification of Embryonic Neural Proteins as Highly Immunogenic Tumor Antigens in Small Cell Lung Cancer. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.* 97, 4198-4203.
- Hall, T.A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* [Computer Software]. USA : Isis Pharmaceuticals.
- Hod, Y. (1992). A Simplified Ribonuclease Protection Assay. *Biotechniques.* 13, 852-854.
- Hugget, J., et al. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity.* 1-6.

- Jian, X.G. (2008). Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1, 67-96.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., dan Kondoh, H. (2000). Pairing SOX Off: with Partners in The Regulation of Embryonic Development. *Trends Genet.* 16, 182-187.
- Kurnia, A. (2010). Identifikasi Imunositokimia Sel Punca Kanker Payudara pada Pasien Penderita Kanker Payudara dengan Menggunakan Imunoflourosensi. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Larkin, M.A., et al. (2007). Clustal *W* and Clustal X *version 2.0* [Computer Software]. UK : The Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin.
- Li, X.L. (2004). Expression of the SRY-related HMG Box Protein SOX2 in Human Gastric Carcinoma. *Int. J. Oncol.* 24, 257-263.
- Lyng, M.B., et al. (2008). Identification of Genes for Normalization of Real-Time RT-PCR Data in Breast Carcinomas. *BMC Cancer.* 8, 20.
- McNeill, R.E., Miller, N., dan Kerin, M.J. (2007). Evaluation and Validation of Candidate Endogenous Control Genes for Real-Time Quantitative PCR Studies of Breast Cancer. *BMC Mol. Biol.* 8, 107.
- McPherson, M. dan Moller, S. (2006). *PCR: The Basics* (Ed. ke-2). UK: Taylor and Francis Group.
- Mei, Z. dan Rosen, J.M. (2006). Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 60-64.
- Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy. (2008). *Breast Disorders: Cancer*. US: Merck & Co. Inc.

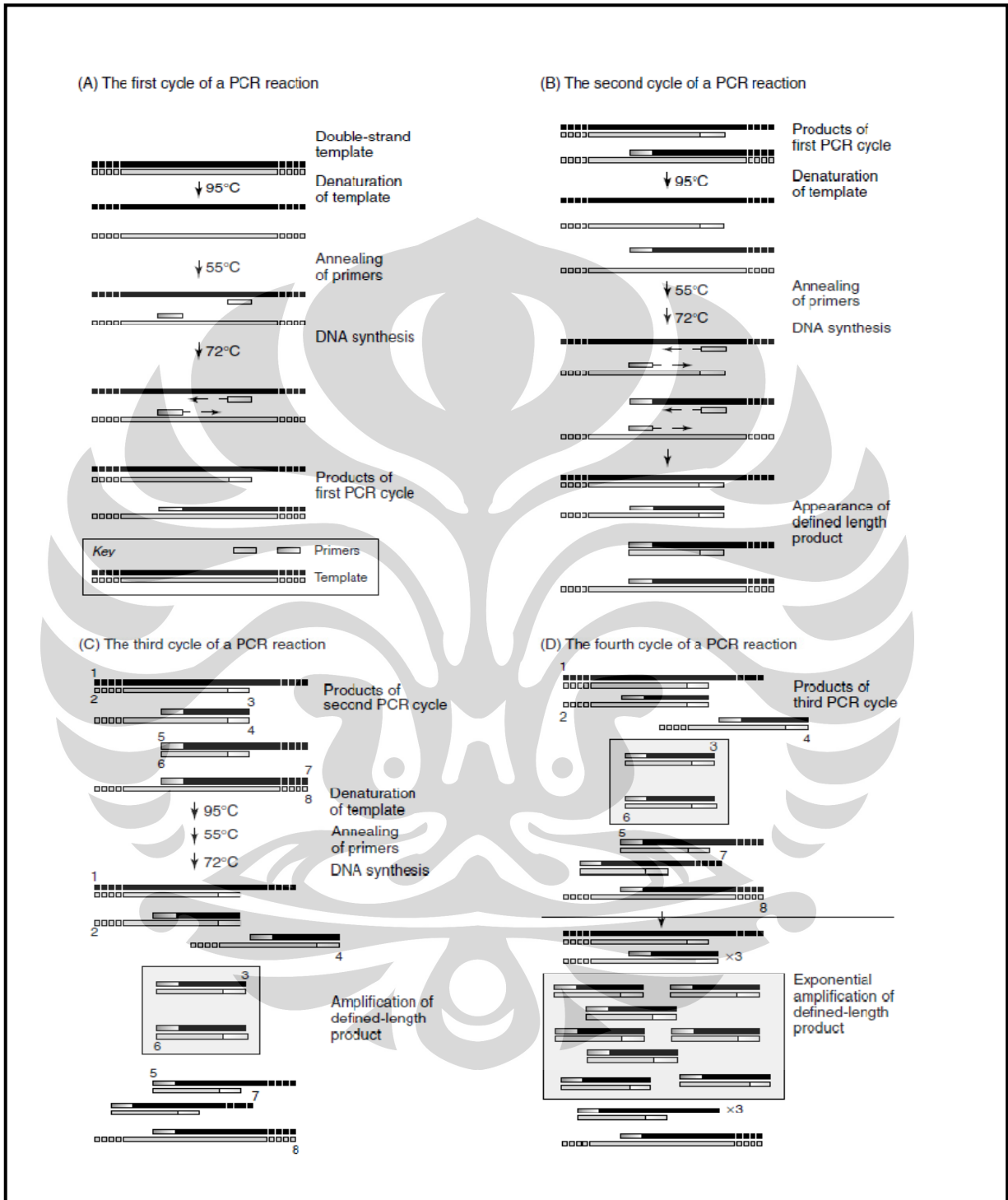
- National Center of Biotechnology Information. (2010).
www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698. 12 Mei 2010.
- Parker, R.M. dan Barnes, N.M. (1999). mRNA: Detection by *In Situ* and Northern Hybridization. *Methods Mol. Biol.* 106, 247-283.
- Pazdur, R., et al. (2008). *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach : Medical, Surgical, & Radiation Oncology* (Ed. ke-11). New York : Cmp United Business Media.
- Radonic, A., et al. (2004). Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.
- Revillion, F., et al. (2000). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression in Human Breast Cancer. *Eur J. Cancer.* 36, 1038-1042.
- Robyt, J.F. dan White, B.J. (1990). *Biochemical Techniques Theory and Practice*. Illinois: Waveland Press.
- Rodda, D.J. (2005). Transcriptional Regulation of NANOG by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 24731-24737.
- Rodriguez-Pinilla, S.M., et al. (2007). SOX2: a Possible Driver of The Basal-Like Phenotype in Sporadic Breast Cancer. *Modern Pathol.* 20, 1006-1012.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Ed. ke-2). NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanada, Y., et al. (2006). Histopathologic Evaluation of Stepwise Progression of Pancreatic Carcinoma with Immunohistochemical Analysis of Gastric Epithelial Transcription Factor SOX2: Comparison of Expression Patterns between Invasive Components and Cancerous or Nonneoplastic Intraductal Components. *Pancreas.* 32, 164–170.

- Sattler, H.P., et al. (2000). Novel Amplification Unit at Chromosome 3q25-q27 in Human Prostate Cancer. *Prostate*. 45, 3, 207-215.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells Among Spleen Colonies. *J. Cell. Physiol.* 62, 327-336.
- Song, L.L. dan Miele, L. (2007). Cancer Stem Cells--an Old Idea That's New Again: Implications for The Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 7, 431-438.
- Szabo, A. (2004). Statistical Modeling for Selecting Housekeeper Genes. *Genome Biol.* 5: R59.
- Takahashi, K. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131, 5, 861-872.
- Tang, C., Beng, T.A., dan Shazib, P. (2007). Cancer Stem Cell: Target for Anti-Cancer Therapy. *Faseb J.* 21, 3777-3778.
- Vandesompele, J., et al. (2002). Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol.* 3, 7, 34.1-34.11.
- Walker, J.M., dan Rapley, R. (2000). *Molecular Biology and Biotechnology* (Ed. ke-4). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Wegner, M. (1999). From Head to Toes: The Multiple Facets of SOX Proteins. *Nucl. Acids Res.* 27, 1409-1420.
- Weis, J.H., et al. (1992). Detection of Rare mRNAs via Quantitative RT-PCR. *Trends Genet.* 8, 263-264.
- Wilfinger, W.W., Mackey, M., dan Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on The Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 22, 474.

- Wilson, M. dan Koopman, P. (2002). Matching SOX: Partner Proteins and Co-factors of the SOX Family of Transcriptional Regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 441-446.
- Wright, M.H., et al. (2008). *BRCA1* Breast Tumors Contain Distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ Cells With Cancer Stem Cell Characteristics. *Breast Cancer Res.* 10, 1, R10
- Yupeng, C., et al. (2008). The Molecular Mechanism Governing the Oncogenic Potential of SOX2 in Breast Cancer. *J. Bio. Chem.* 283, 26, 17969–17978.
- Zhou, S., et al. (2001). The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and is a Molecular Determinant of The Side-Population Phenotype. *Nat. Med.* 7, 2436-2444.

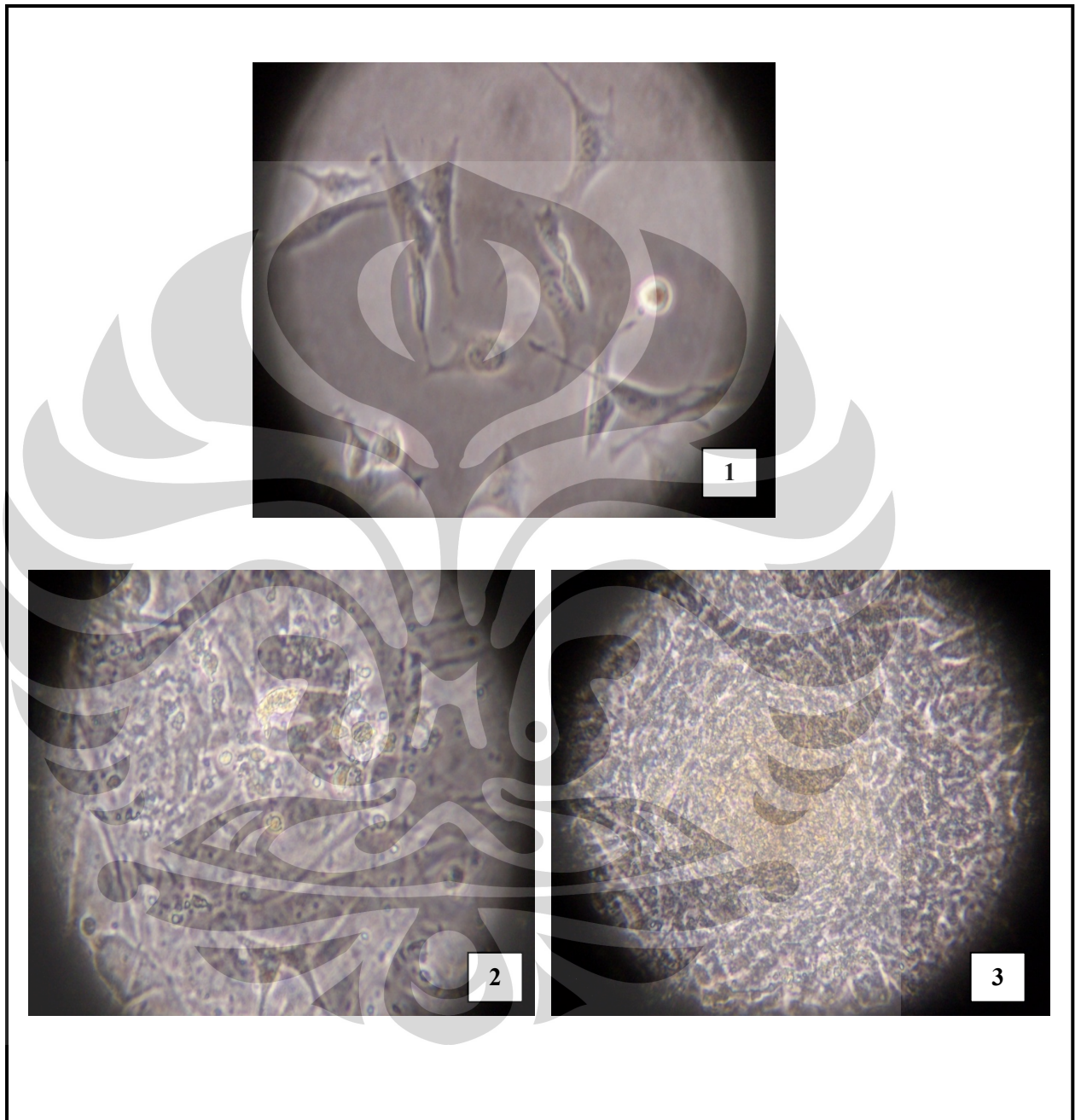






[Sumber: McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.9. Proses PCR



Gambar 4.1. Pertumbuhan sampel sel normal dan sel kanker 1. CS 8 normal;
2. CS 14 normal; 3. CS14 kanker



Gambar 4.2. Mikroskop [Olympus,USA]



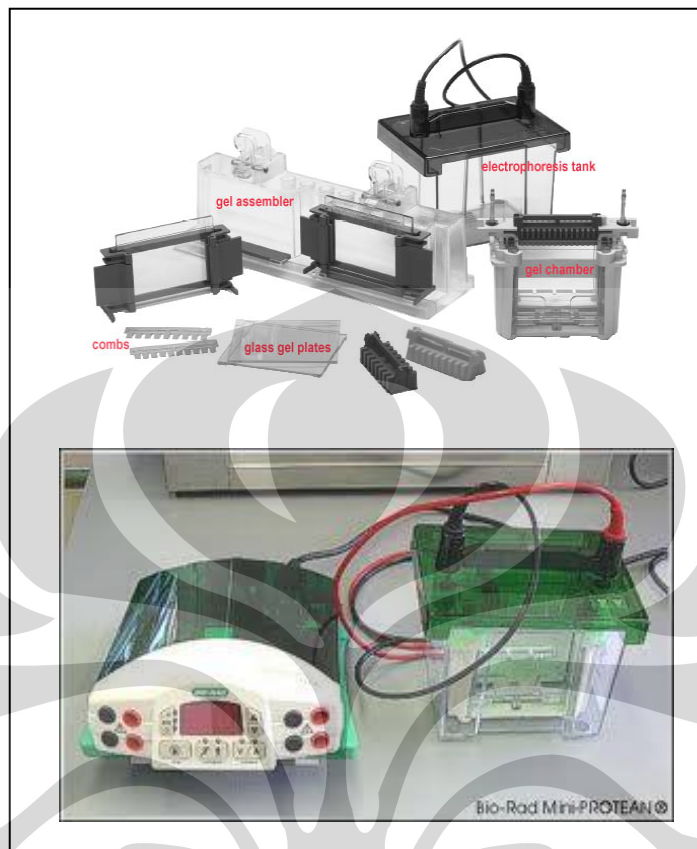
Gambar 4.3. Sentrifus [Tomy Digital Biology, Jepang]



Gambar 4.4. Mikrosentrifus [Sorvall-Biofuge, USA]



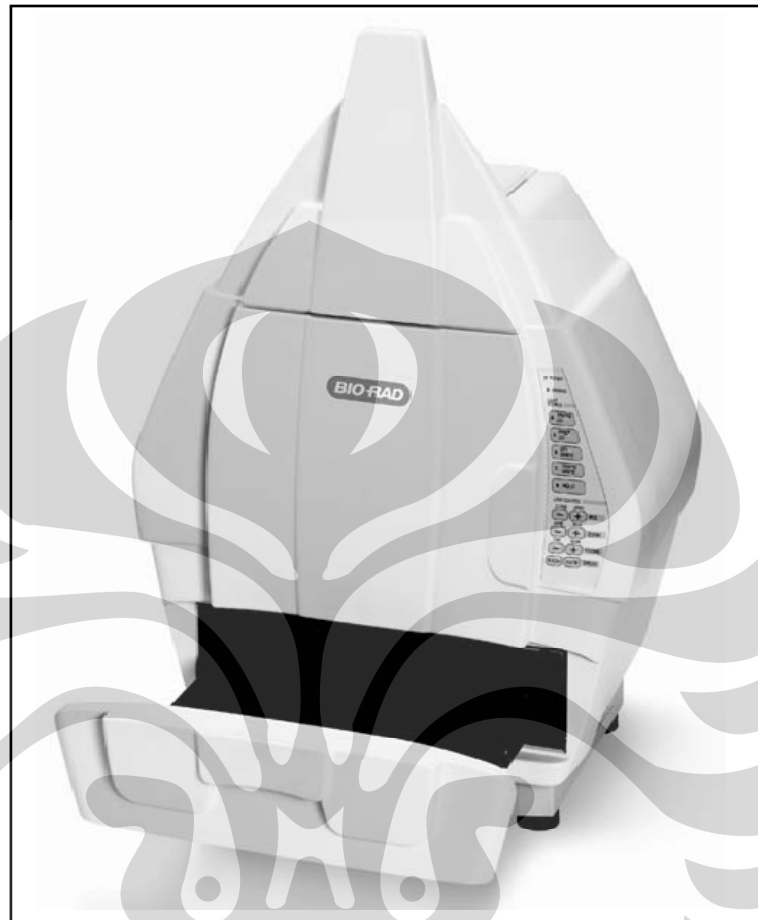
Gambar 4.5. Spektrofotometer NanoDrop ND1000 [Thermo Scientific, USA]



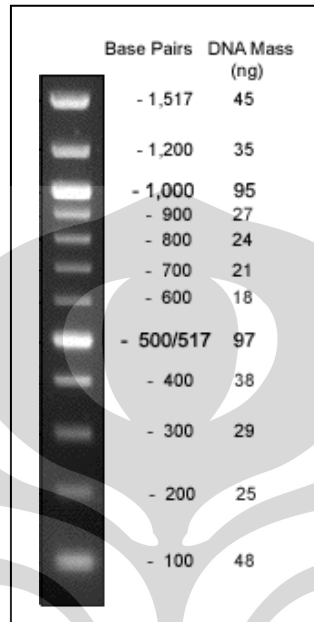
Gambar 4.6. Alat cetakan dan elektroforesis gel akrilamid [Biorad,USA]



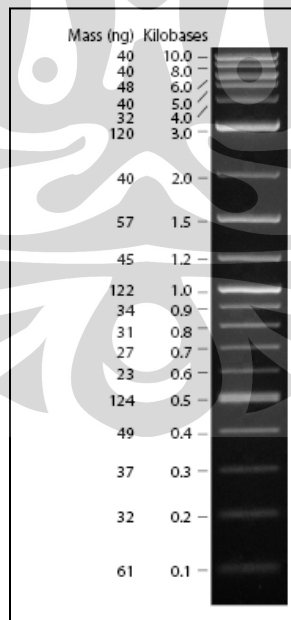
Gambar 4.7. Alat PCR [MJ Research, USA]



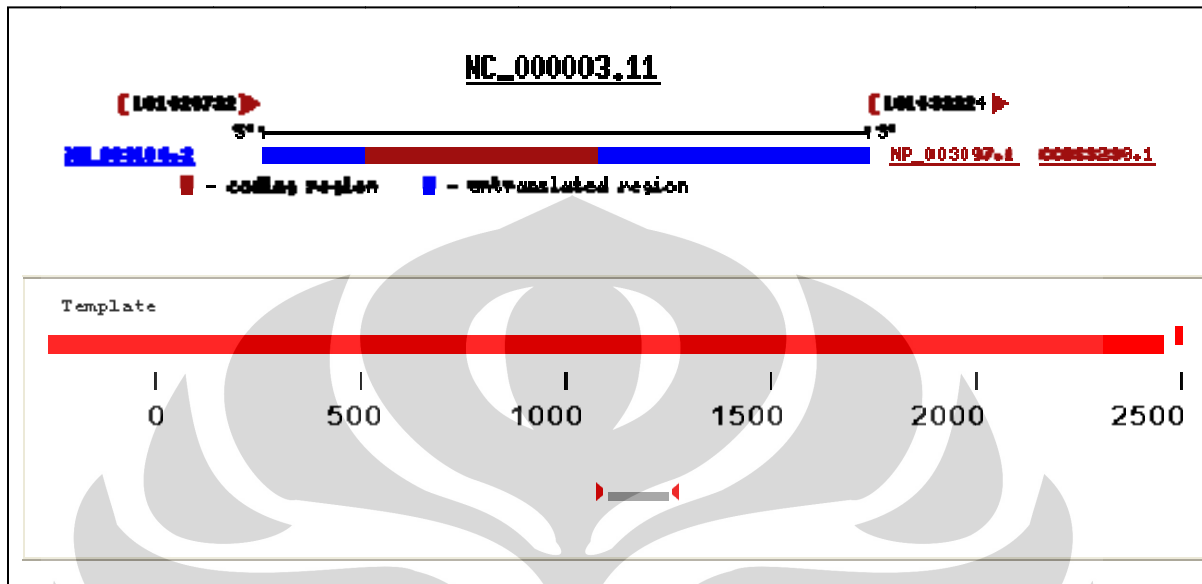
Gambar 4.8. UV transiluminator [Biorad, USA]



Gambar 4.9. Penanda 100 bp [New England Biolabs, UK]

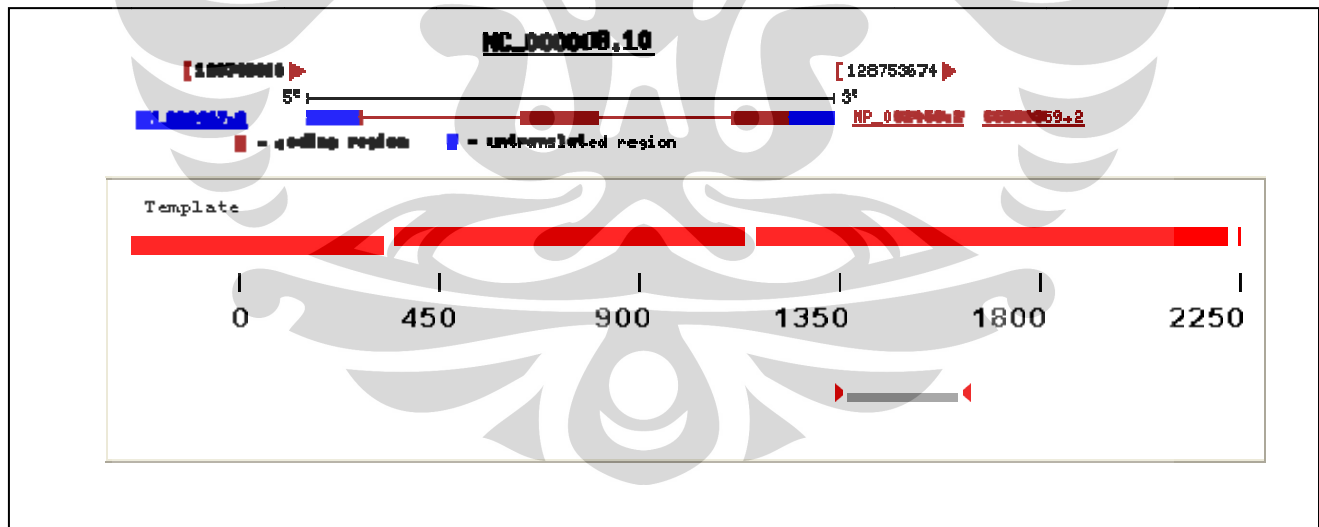


Gambar 4.10. Penanda 2 Log [New England Biolabs, UK]



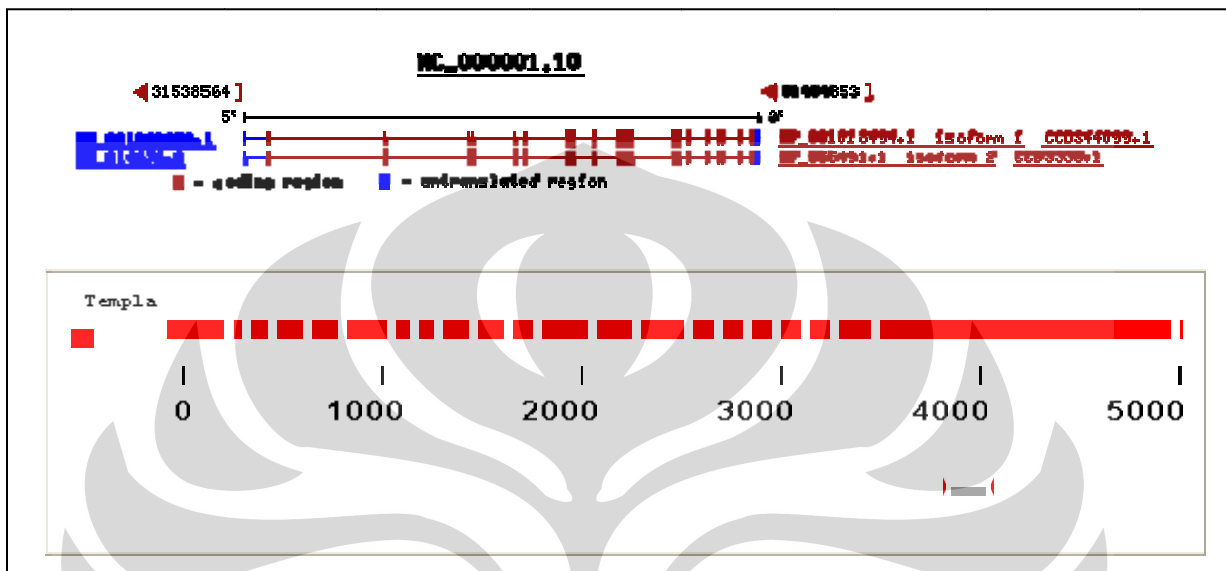
[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657]

Gambar 4.11. Posisi desain primer SOX2



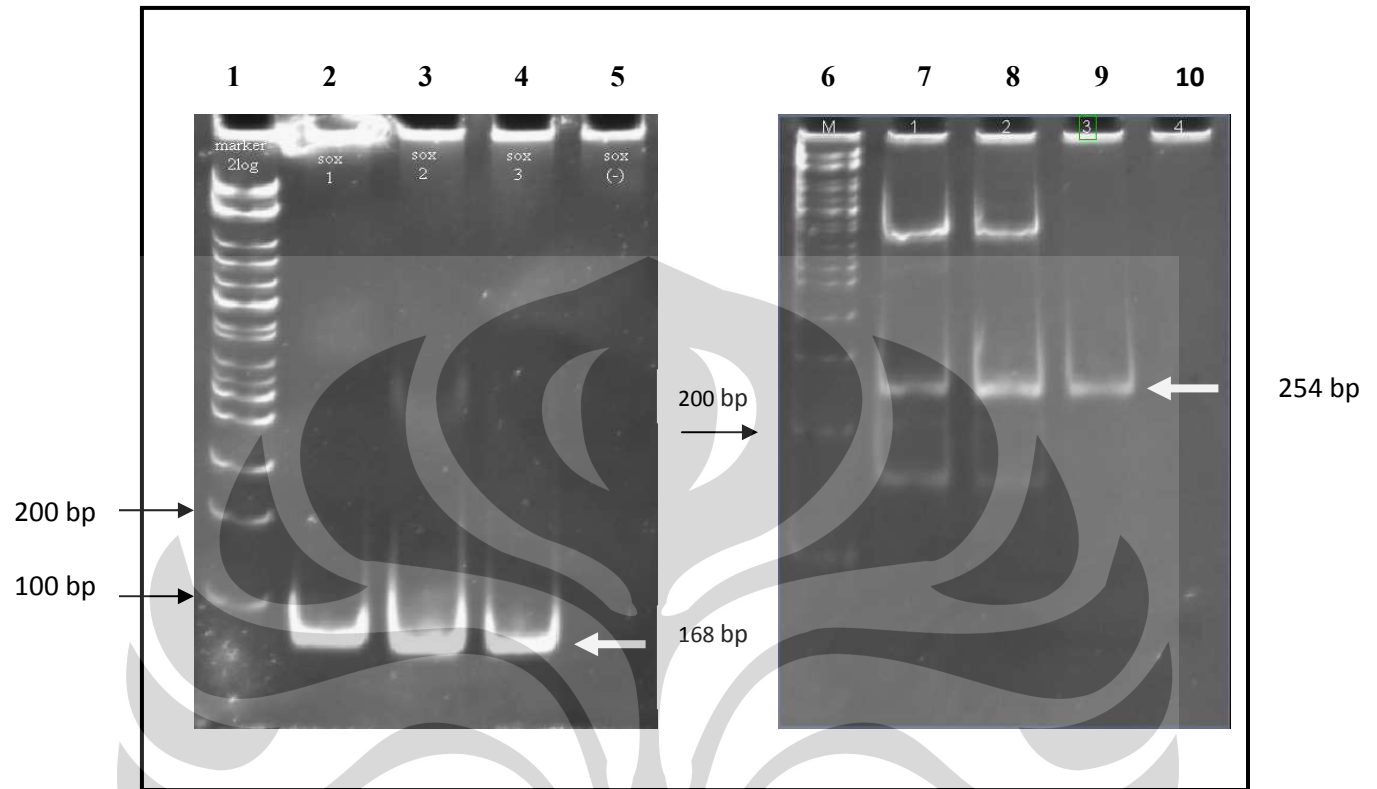
[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4609, 12 Mei 2010]

Gambar 4.12. Posisi desain primer c-Myc

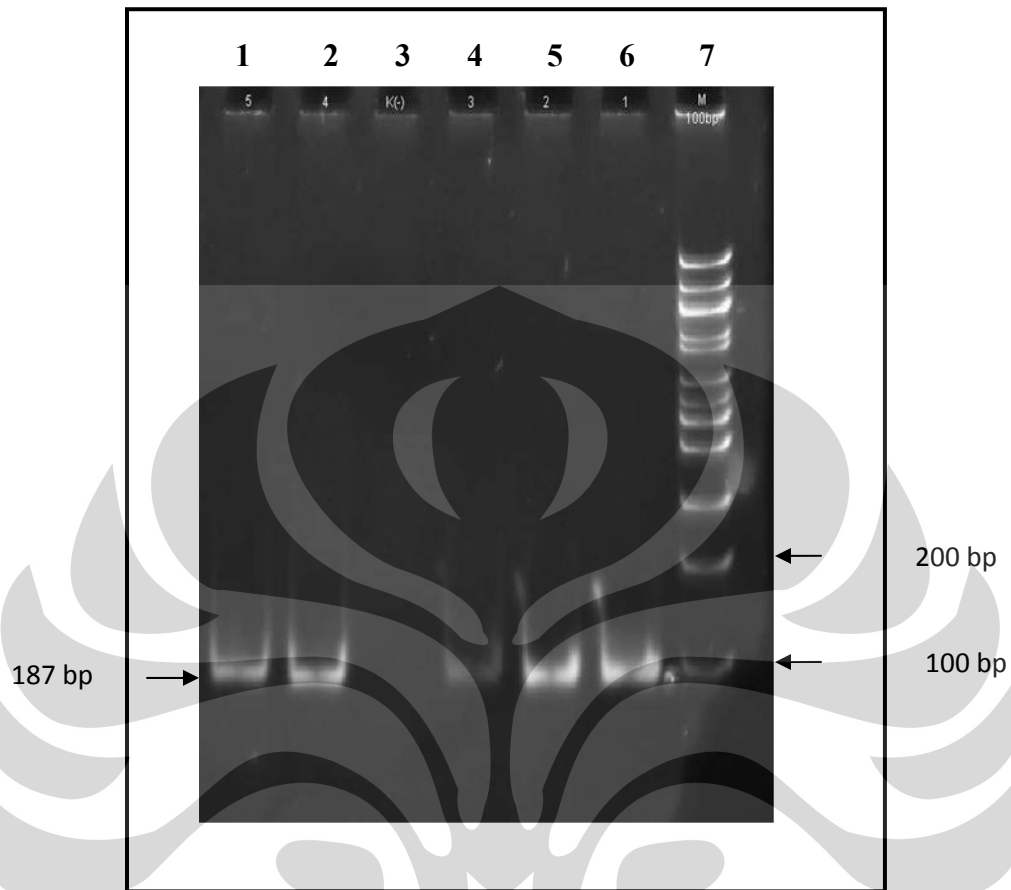


[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 12 Mei 2010]

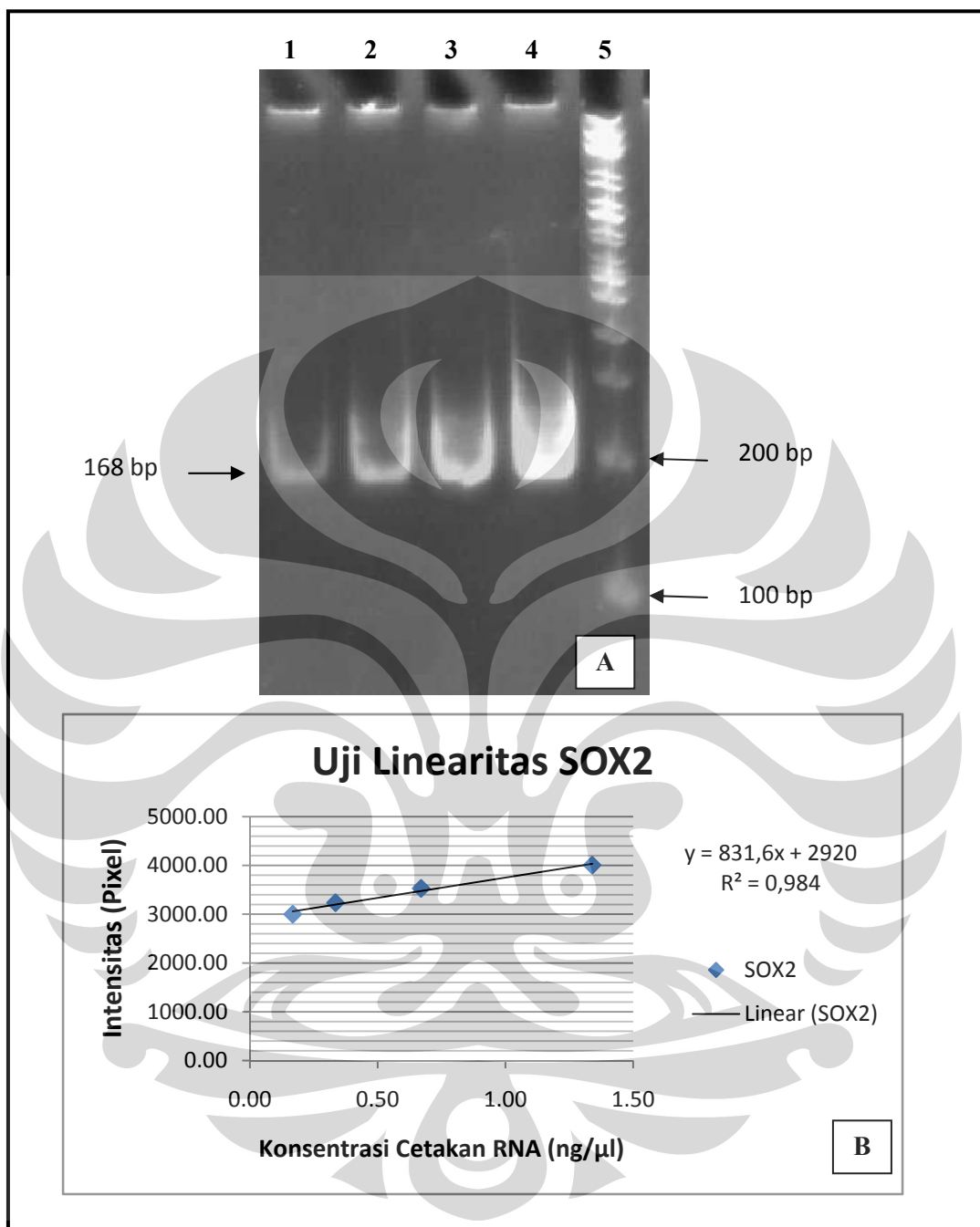
Gambar 4.13. Posisi desain primer PUM1.



Gambar 4.14. Hasil optimasi PCR untuk SOX2 dan c-Myc. 1. Marker 2 Log; 2. SOX2 suhu 55; 3. SOX2 suhu 57; 4. SOX2 suhu 59; 5. SOX2 kontrol negatif; 6. Marker 2 Log; 7. c-Myc suhu 55; 8. c-Myc suhu 57; 9. c-Myc suhu 59; 10. c-Myc kontrol negatif

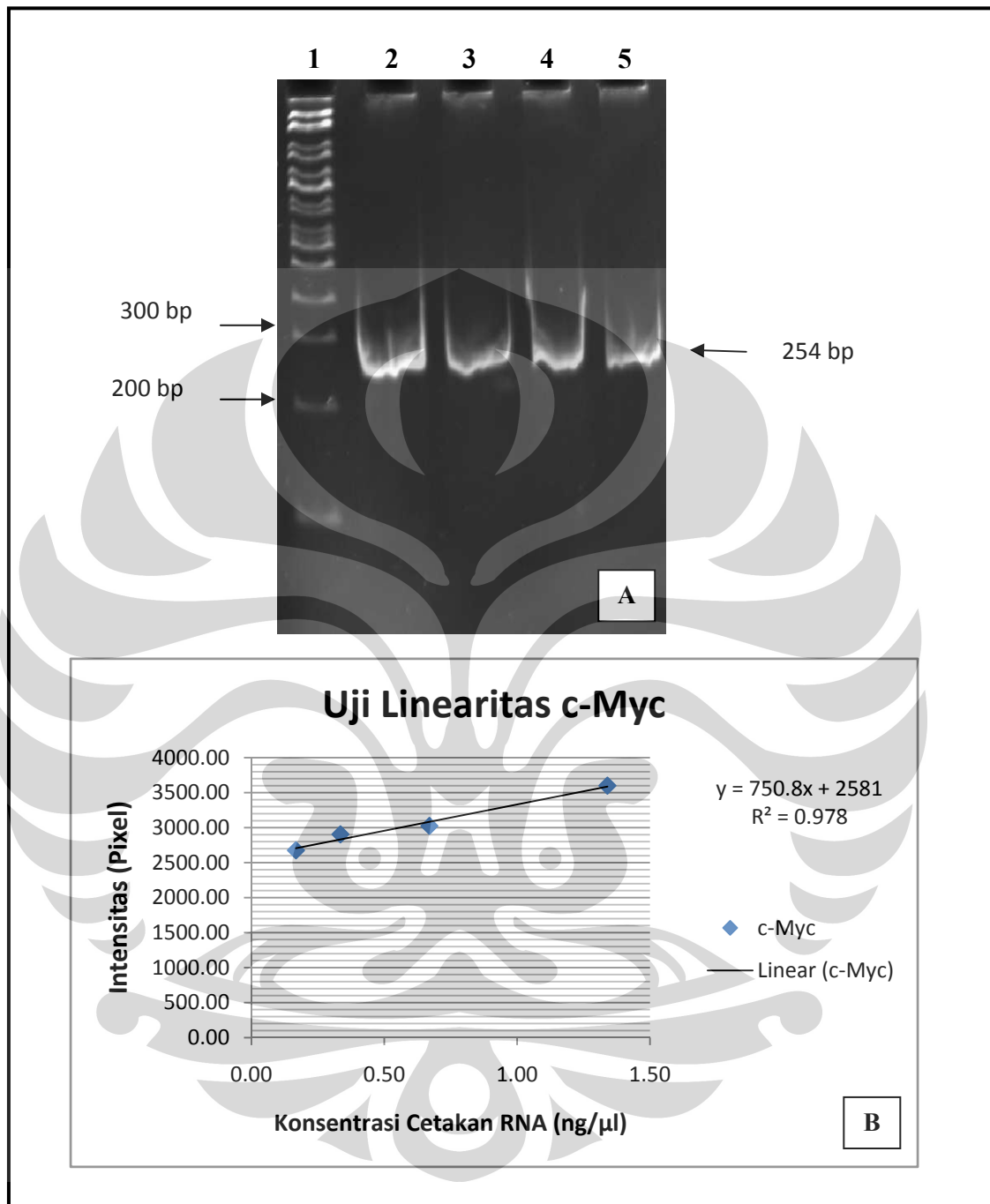


Gambar 4.15. Hasil optimasi PCR untuk PUM1. 1. 60°C; 2. 57°C; 3. 65°C; 4. 65°C ; 5. 59°C ; 6. 55°C; 7. Marker 2 Log;



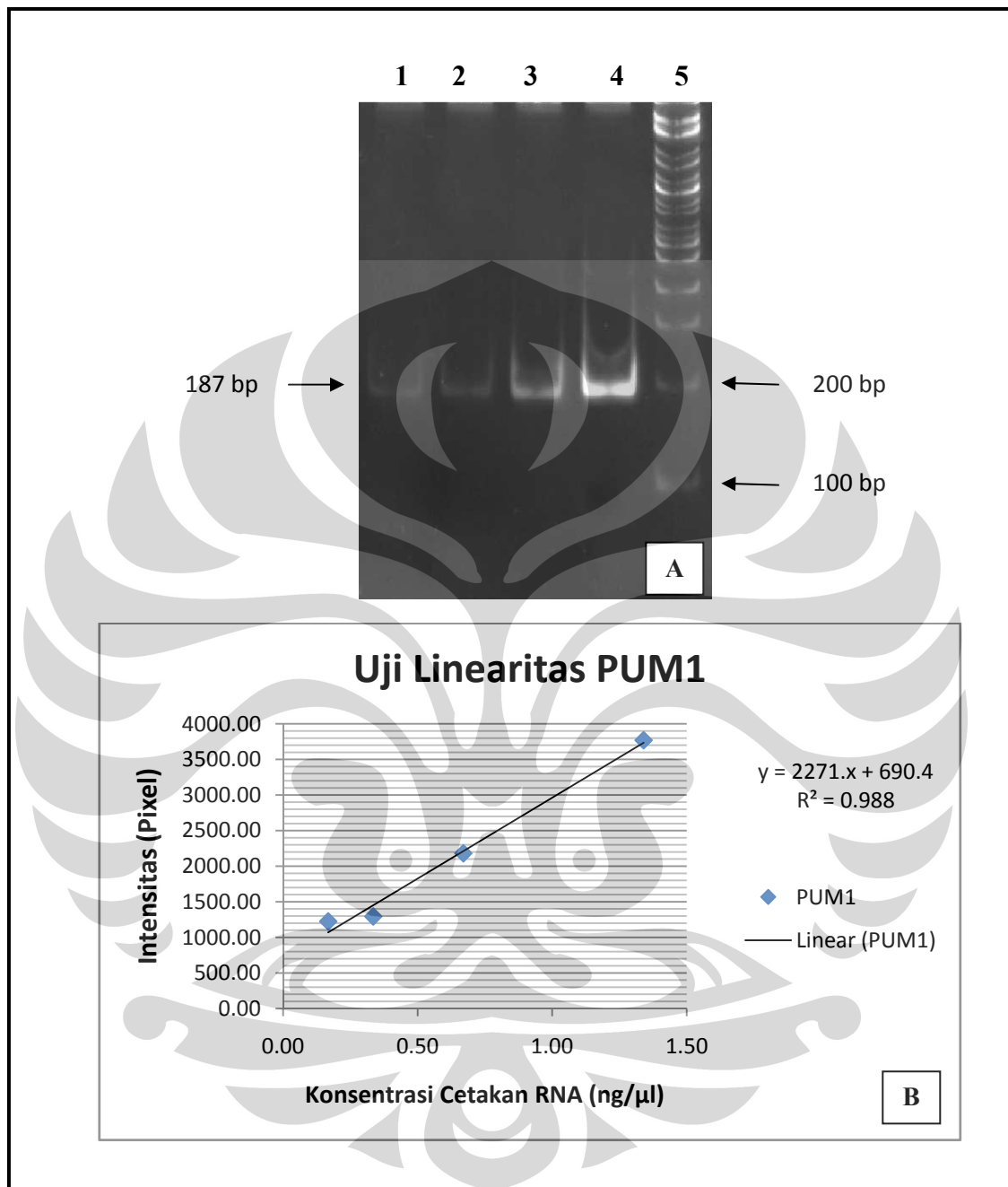
Gambar 4.16. A. Hasil uji linearitas SOX2. 1. Konsentrasi 0,155 ng/μl ; 2. Konsentrasi 0,31 ng/μl; 3. Konsentrasi 0,62 ng/μl; 4. Konsentrasi 1,24 ng/μl; 5. Marker 2 Log.

B. Kurva uji linearitas SOX2

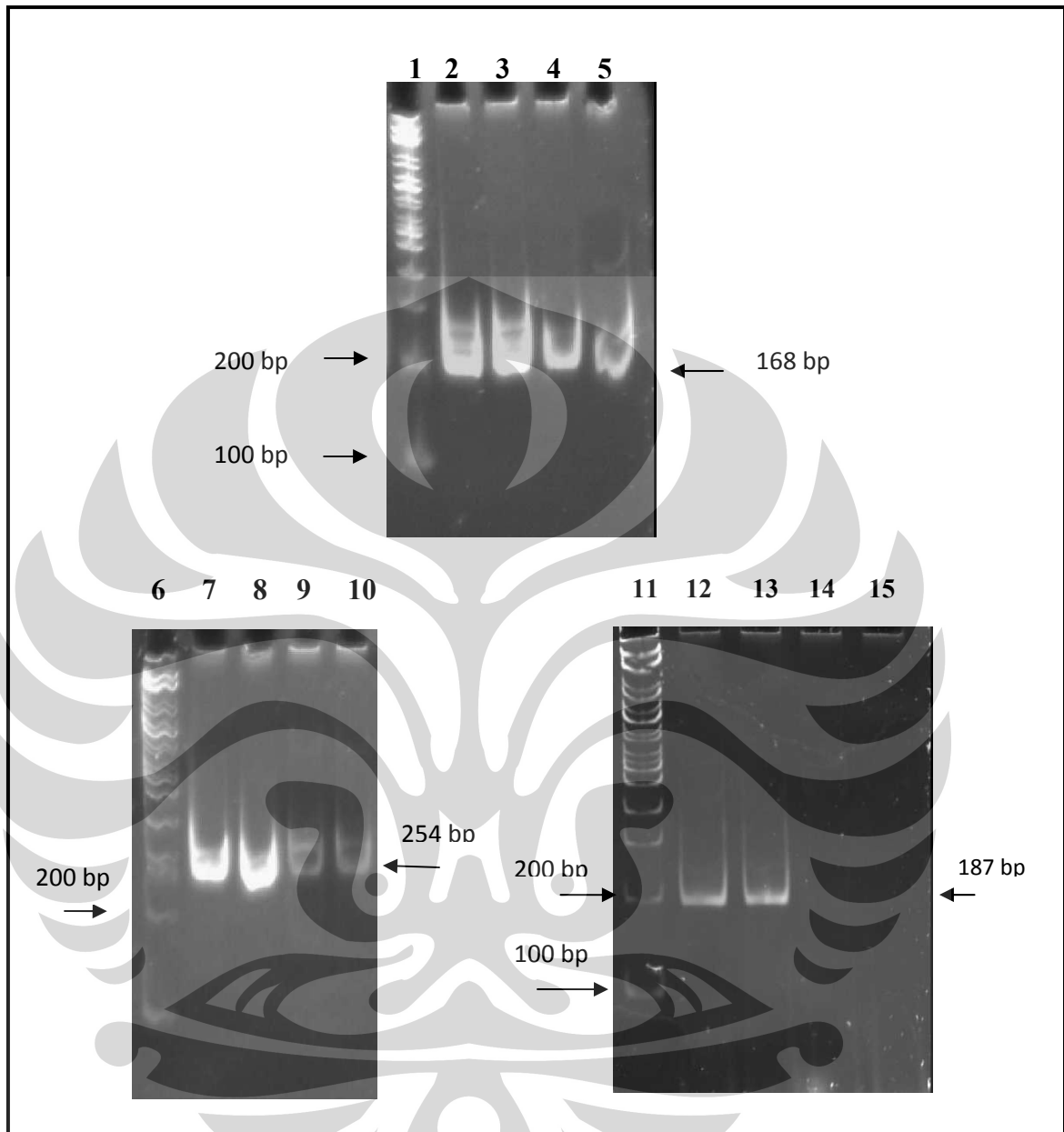


Gambar 4.17. A. Hasil uji linearitas c-Myc. 1. Marker 2 Log; 2. Konsentrasi 1,24 ng/μl
 3. Konsentrasi 0,62 ng/μl; 4. Konsentrasi 0,31 ng/μl; 5. Konsentrasi 0,155 ng/μl.

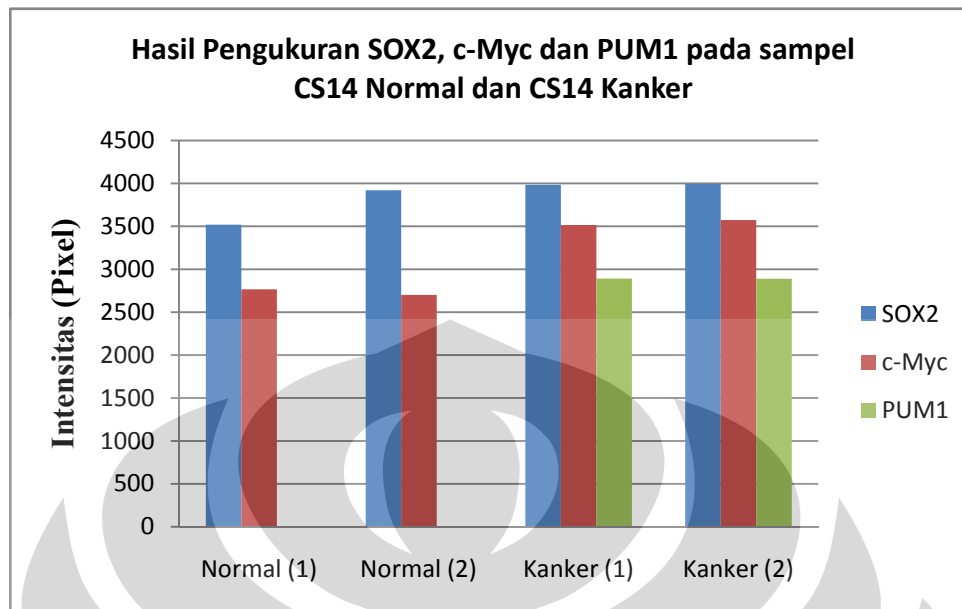
B. Kurva uji linearitas c-Myc



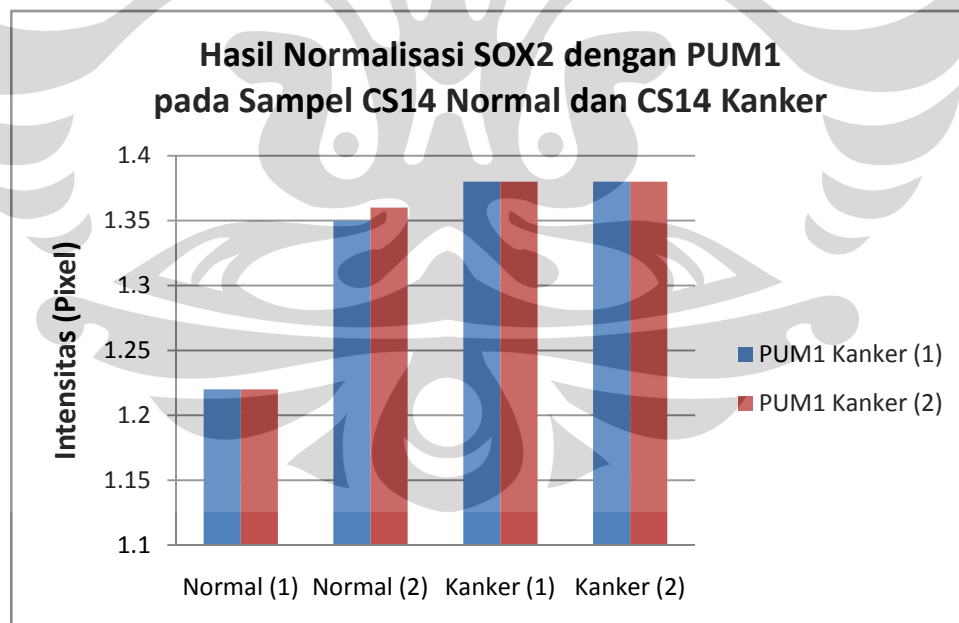
Gambar 4.18. A. Hasil uji linearitas PUM1. 1. Konsentrasi 0,155 ng/μl ; 2. Konsentrasi 0,31 ng/μl; 3. Konsentrasi 0,62 ng/μl; 4. Konsentrasi 1,245 ng/μl. Marker 2 Log.
B. Kurva uji linearitas PUM1



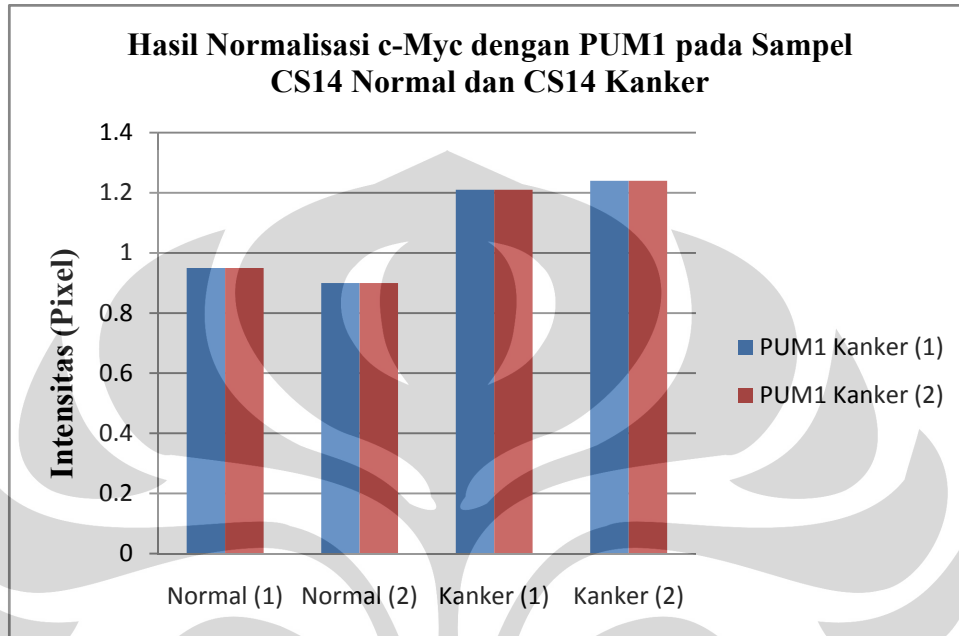
Gambar 4.19. Hasil pengukuran SOX2, c-Myc dan PUM pada sampel CS14 normal dan CS 14 kanker. 1. Marker 2 Log; 2. SOX2 pada CS14 kanker (1); 3. SOX2 pada CS14 kanker (2); 4. SOX2 pada CS14 normal (1); 5. SOX2 pada CS14 normal (2); 6. Marker 2 Log; 7. c-Myc pada CS14 kanker (1); 8. c-Myc pada CS14 kanker (2); 9. c-Myc pada CS14 normal (1); 10. c-Myc pada CS14 normal (2); 11. Marker 2 Log; 12. PUM1 pada CS14 kanker (1); 13. PUM1 pada CS14 kanker (2); 14. PUM1 pada CS14 Normal(1); 15. PUM1 pada CS14 normal (2)



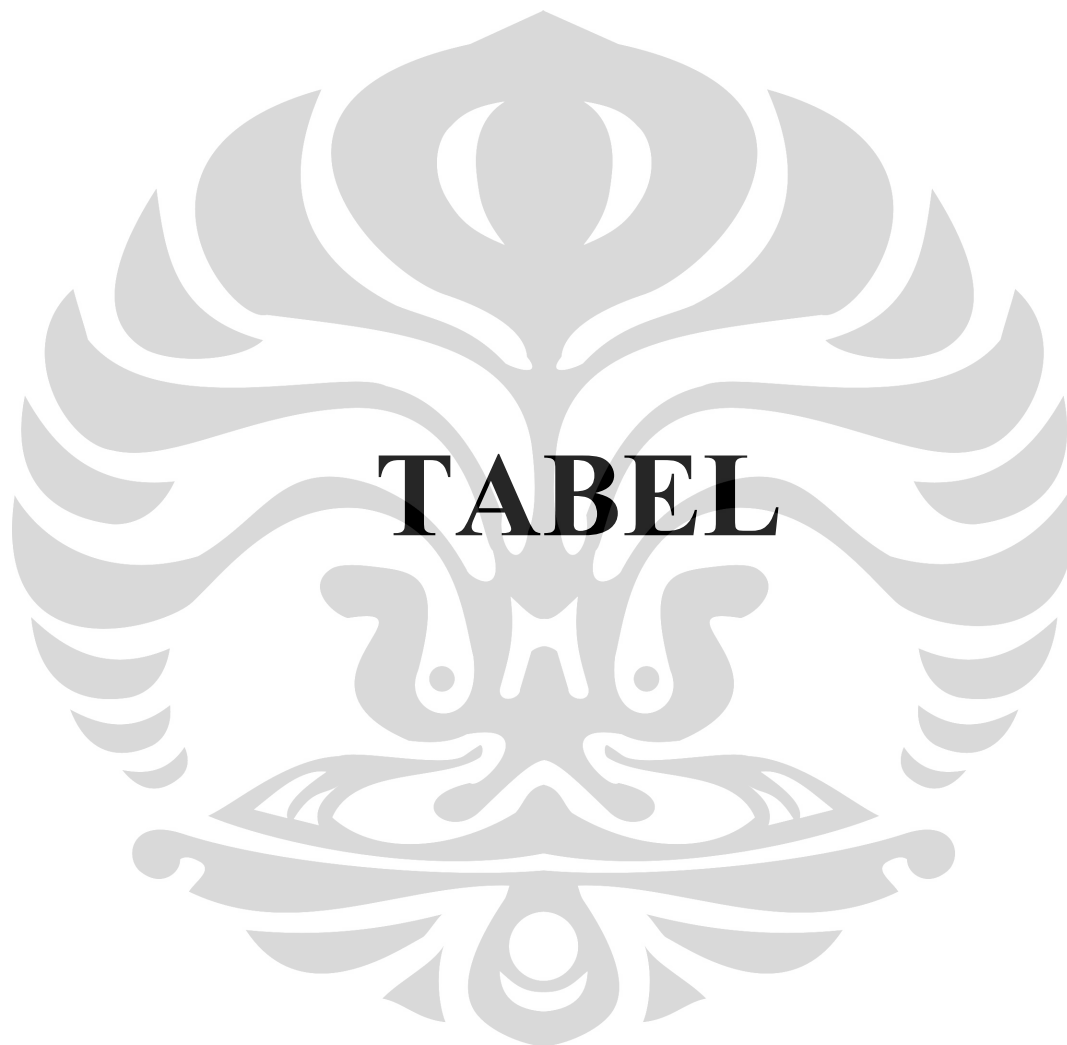
Gambar 4.20. Kurva hasil pengukuran SOX2, c-Myc dan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker



Gambar 4.21. Kurva hasil normalisasi SOX2 dengan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker



Gambar 4.22. Kurva hasil normalisasi c-Myc dengan PUM1 pada sampel CS14 Normal dan CS14 Kanker



Tabel 3.1.

Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses RT-PCR

OneStep RT-PCR [Qiagen] (Anonim, 2008)

| No | Komposisi | Volume | Konsentrasi akhir |
|--------------|--|---------|-------------------|
| 1 | Air bebas nuklease | 1,65 ul | - |
| 2 | 5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer | 2 ul | 1x |
| 3 | Qsolution | 2 ul | - |
| 4 | Primer Forward (20 uM/ul) | 0,6 ul | 1,2 uM |
| 5 | Primer Reverse (20 uM/ul) | 0,6 ul | 1,2 uM |
| 6 | dNTP mix (masing-masing nukleotida 10 mM) | 0,4 ul | 400 uM |
| 7 | MgCl ₂ (25 mM) | 0,25 ul | 0,625 mM |
| 8 | RNAse Inhibitor (50 unit/ul) | 0,1 ul | - |
| 9 | Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix | 0,4 ul | - |
| 10 | RNA cetakan | 2 ul | 1,74 ng/ul |
| Volume akhir | | 10 ul | |

Tabel 3.2.
Urutan Basa Primer untuk RT-PCR

| No | Nama Primer dan Komposisi Basa | Jumlah nukleotida | Suhu Leleh (°C) | % GC | Mulai | Berhe |
|----|--|----------------------|--------------------|--------|-------|-------|
| 1 | SOX2 F (NM_003106.2) 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3' | 18 | 50,69 | 55,56% | 890 | 907 |
| | SOX2 R 5'-CATGGAGTTGTACTGCAGG-3' | 19 | 49,94 | 52,63% | 1057 | 1039 |
| | Panjang amplicon 168 | | | | | |
| | <hr/> | | | | | |
| 2 | c-Myc F (NM_002467.4) 5'-TCTCAACGACAGCAGCTC-3' | 18 | 51,42 | 55,56% | 1164 | 1181 |
| | c-Myc R 5'-AAGGTGATCCAGACTCTGAC-3' | 20 | 50,43 | 50,00% | 1417 | 1398 |
| | Panjang amplicon 254 | | | | | |
| | <hr/> | | | | | |
| 3 | PUM1 F (NM_001020658.1) 5'-TGAGGTGTGCACCATGAAC-3' | 19 | 52,23 | 52,63% | 3416 | 3434 |
| | PUM1 R 5'-CAGAATGTGCTTGCCATAGG-3' | 20 | 51,13 | 50,00% | 3602 | 3583 |
| | Panjang amplicon 187 | | | | | |
| | <hr/> | | | | | |

Tabel 4.1.
 Hasil optimasi SOX2, c-Myc, dan PUM1

| No | Gen | Suhu (°C) | Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel) |
|----|-------|--------------|--|
| 1 | SOX2 | 55 | 3133,268 |
| | | 57 | 3334,665 |
| | | 59 | 3154,837 |
| 2 | c-Myc | 55 | 2167,894 |
| | | 57 | 2174,277 |
| | | 59 | 2046,640 |
| 3 | PUM1 | 55 | 1535,503 |
| | | 57 | 1540,386 |
| | | 59 | 1456,180 |
| | | 60 | 1536,578 |
| | | 65 | 1083,315 |

Tabel 4.2.
Hasil uji linearitas

| No | Gen | Konsentrasi (ng/ μ l) | Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel) |
|----|-------|------------------------------|--|
| 1 | SOX2 | 1,245 | 4007,000 |
| | | 0,62 | 3530,500 |
| | | 0,31 | 3234,760 |
| | | 0,155 | 2998.754 |
| 2 | c-Myc | 1,245 | 3601,563 |
| | | 0,62 | 3025,814 |
| | | 0,31 | 2906,000 |
| | | 0,155 | 2677,064 |
| 3 | PUM1 | 1,245 | 3769.938 |
| | | 0,62 | 2181.000 |
| | | 0,31 | 1293.563 |
| | | 0,155 | 1224.000 |

Tabel 4.3.
 Hasil pengukuran SOX2, c-Myc dan PUM1
 pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker

| No | Gen | Sampel CS14 | Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel) |
|----|-------|-------------|-------------------------------------|
| 1 | SOX2 | Normal (1) | 3518,938 |
| | | Normal (2) | 3920,125 |
| | | Kanker (1) | 3983,625 |
| | | Kanker (2) | 3994,028 |
| 2 | c-Myc | Normal (1) | 2766,938 |
| | | Normal (2) | 2701,938 |
| | | Kanker (1) | 3516,327 |
| | | Kanker (2) | 3573,813 |
| 3 | PUM1 | Normal (1) | - |
| | | Normal (2) | - |
| | | Kanker (1) | 2891,567 |
| | | Kanker (2) | 2889,509 |

Tabel 4.4.
 Hasil normalisasi SOX2 dan c-Myc dengan PUM1
 pada sampel CS14 normal dan CS14 kanker

| No | Gen | Gen yang digunakan untuk normalisasi | Sampel CS14 | Hasil Normalisasi |
|----|-------|--------------------------------------|-------------|-------------------|
| 1 | SOX2 | PUM1 Kanker (1) | Normal (1) | 1,22 |
| | | | Normal (2) | 1,35 |
| | | | Kanker (1) | 1,38 |
| | | | Kanker (2) | 1,38 |
| | | PUM1 Kanker (2) | Normal (1) | 1,22 |
| | | | Normal (2) | 1,36 |
| | | | Kanker (1) | 1,38 |
| | | | Kanker (2) | 1,38 |
| 2 | c-Myc | PUM1 Kanker (1) | Normal (1) | 0,95 |
| | | | Normal (2) | 0,90 |
| | | | Kanker (1) | 1,21 |
| | | | Kanker (2) | 1,24 |
| | | PUM1 Kanker (2) | Normal (1) | 0,95 |
| | | | Normal (2) | 0,90 |
| | | | Kanker (1) | 1,21 |
| | | | Kanker (2) | 1,24 |



Lampiran 1

Komposisi DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)

| Komposisi | Konsentrasi (mg/L) |
|--------------------------|---------------------------|
| Asam amino | |
| Glisin | 30 |
| L-Arginin hidroklorida | 84 |
| L-Sistein. 2HCl | 63 |
| L-Glutamin | 584 |
| L-Histidin | 42 |
| L-Isoleusin | 105 |
| L-Leusin | 105 |
| L-Lisin hidroklorida | 146 |
| L-Metionin | 30 |
| L-Fenilalanin | 66 |
| L-Serin | 42 |
| L-Treonin | 95 |
| L-Triptofan | 16 |
| L-Tirosin | 104 |
| L-Valine | 94 |
| Vitamin | |
| Kolin Klorida | 4 |
| D-kalsium pantotenat | 4 |
| Asam folat | 4 |
| Niasinamid | 4 |
| Piridoksin hidroklorida | 4 |
| Riboflavin | 0,4 |
| Tiamin hidroklorida | 4 |
| i-Inositol | 7,2 |
| Garam inorganik | |
| Kalsium klorida anhidrat | 200 |

Lampiran 1 (Lanjutan)
Komposisi DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)

| Komposisi | Konsentrasi (mg/L) |
|---------------------------|---------------------------|
| Feri nitrat | 0,1 |
| Magnesium sulfat anhidrat | 97,67 |
| Kalium klorida | 400 |
| Natrium klorida | 6400 |
| Natrium fosfat | 125 |
| Komponen lain | |
| D-glukosa | 4500 |
| Fenol merah | 15 |
| Natrium piruvat | 110 |

Lampiran 2
Surat persetujuan komisi 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. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Lampiran 3
Spesifikasi primer SOX2

| EUROGENTEC AIT | | Oligo Technical Data Sheet | |
|--|--|---|--|
| EUROGENTEC AIT 26 Ayer Rajah Crescent #07-10 Singapore 139944 Tel: +65 6778 6822 Fax: +65 6778 2962 Email: oligos@aitbiotech.com | | Customer: Budiman Address: Indonesia Order Number: AIT6929 Order Date: 07/08/2009 Remarks: | |
| Oligo Name: Sox2mid-463F 5'CAGCGCATGGACAGTTAC3' | | Oligo Number: 55004 | |
| Delivered: 13 OD 431 ug 78.24 nmol Conc.: 782ul to 100 uM | No. Bases: 18 MW: 5509 Tm: 45.2 | Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MalDI-TOF | |
| Oligo Name: Sox2mid-630R 5'CATGGAGTTGTACTGCAGG3' | | Oligo Number: 55007 | |
| Delivered: 8 OD 276 ug 46.91 nmol Conc.: 469ul to 100 uM | No. Bases: 19 MW: 5884 Tm: 46 | Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MalDI-TOF | |
| Printed on: 8/12/2009 2:45:54 PM | | Page 2 | |

Lampiran 4
Spesifikasi primer c-Myc

| EUROGENTEC AIT | | Oligo Technical Data Sheet | |
|--|--|---|--|
| EUROGENTEC AIT 26 Ayer Rajah Crescent #07-10 Singapore 139944 Tel: +65 6778 8822 Fax: +65 6778 2962 Email: oligos@aitbiotech.com | | Customer: Budiman Address: Indonesia Order Number: AIT6929 Order Date: 07/08/2009 Remarks: | |
| Oligo Name: c-mycmid-639F 5'TCTCAACGACAGCAGCTC3' | | Oligo Number: 55002 | |
| Delivered: 7 OD 231 ug 42.55 nmol Conc.: 426ul to 100 uM | No. Bases: 18 MW: 5429 Tm: 45.2 | Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MALDI-TOF | |
| Oligo Name: c-myomid-892R 5'AAGGTGATCCAGACTCTGAC3' | | Oligo Number: 55005 | |
| Delivered: 12 OD 383 ug 62.52 nmol Conc.: 625ul to 100 uM | No. Bases: 20 MW: 6126 Tm: 46.7 | Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MALDI-TOF | |
| Printed on: 8/12/2009 2:45:54 PM | | Page 2 | |

Lampiran 5
Spesifikasi primer PUM1

PT. GENETIKA SCIENCE INDONESIA
Jln. Keadilan Raya No. 17F
Jakarta Barat, 11130
Indonesia
Customer Name: Ibu Wéndrayani

Order ID : 85358
PO Number : PTGEN-2055
Report Date : 09-Apr-2010
Total Oligos : 2

1stBASE
Your Research. Our Business

Oligonucleotide Datasheet for Ibu Wéndrayani

| SynthID | Oligo Name | Sequence | Mod | Len | Scale | Purity | Tm(T) | GC(%) | MW | OD | µg | pmol | To make 100 µM |
|---------|------------|----------------------------------|-----|-----|----------|-----------|-------|-------|------|-----|-------|-------|-------------------|
| 731132 | PUM1F | 5'-TGA GGT GTG CAC CAT GGA AC-3' | | 20 | 50 nmole | PCR Grade | 62.4 | 55.0 | 6182 | 7.6 | 239.7 | 30776 | add 308µl of dH2O |
| 731133 | PUM1R | 5'-CAG AAT GTG CTT GCC ATA GG-3' | | 20 | 50 nmole | PCR Grade | 60.4 | 50.0 | 6157 | 5.3 | 168.0 | 27291 | add 273µl of dH2O |


Mixed Bases Nomenclature
R : ag
H : ac
Y : ct
B : g/c
M : ac
V : a/c
K : g/t
N : a/g/c/t
W : at
D : g/a/t
S : g/c

Handling Procedures for Oligonucleotides
It is recommended that oligos be suspended in a sterile buffered solution (i.e. 1xTE at pH8) for longer shelf-life.
When re-suspending your oligo, vortex them sufficiently but we don't recommend spinning down after re-suspension.
If your oligos delivered in wet format, it will be in the concentration (e.g. 100µM) as per your ordering instruction.
Always aliquot oligo into your working solution to prevent contamination to your stock. Keep oligos in -20°C.

Ordering and Technical Support
Ordering/Enquiries: oligo@base-asia.com
Technical Support: support@base-asia.com
Orders received after 5pm (GMT+8) will be processed the next working day.

Page 1 of 1

Lampiran 6
Sertifikat analisis RNeasy Mini Kit



QIAGEN Certificate of Analysis

Product Name: **RNeasy Mini Kit**
 Cat. No. : **74104**
 Lot Number: **127149543**

Quality Control Passed

Membrane control:
 The RNA-binding capacity was tested by determining the recovery obtained with 122-138 µg of input total carrier RNA on 0.4 cm² of membrane. Greater than 80% recovery was obtained.
 As tested by PCR, no PCR inhibitors were released from the membrane.

Buffer control:
 Conductivity and pH of buffers were tested and found to be within the ranges below:

| | Conductivity (mS/cm) | pH | |
|------------------|-----------------------------|-----------|-------------------------------------|
| Buffer RLT | 25.40–30.52 (1/10 dilution) | 6.70–7.20 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Buffer RW1 | 29.02–33.75 (1/2 dilution) | 7.30–7.70 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Buffer RPE | 3.19–3.83 | 7.30–7.70 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| RNase-free water | < 0.005 | – | <input checked="" type="checkbox"/> |

Absence of RNase activity was checked by incubation of RNA in RNase-free water and Buffer RPE at 37°C for 3 hours.

RNeasy Spin Columns
 RNeasy spin columns were tested by preparation of total RNA from 5x10⁶ HeLa cells and from 3 mg of tissue (mouse kidney). Average yields and purities were:


| | | |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| HeLa: | ≥ 75 µg total RNA | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Kidney: | ≥ 6 µg total RNA | <input checked="" type="checkbox"/> |
| A ₂₆₀ /A ₂₈₀ : | 1.9 – 2.3 (at pH 7.5) | <input checked="" type="checkbox"/> |

Integrity and size distribution of total RNA was checked by denaturing agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. Two sharp 28S and 18S ribosomal RNA bands appeared on the stained gel without any smear towards the smaller sized RNAs.

Storage conditions
 RNeasy Kits should be stored dry at room temperature (15–25°C).

Certified by: *A. Ordees* Date: 05/12/10
0905/1 (mm/dd/yy)

Lampiran 7
Sertifikat analisis Qiagen OneStep RT-PCR



QIAGEN® Certificate of Analysis

Product Name: **QIAGEN OneStep RT-PCR Kit**
 Cat. No. : **210212**
 Mat. No. **1054480**
 Lot Number: **136238474**

Quality Control **Passed**

QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix:
 The enzymes included in the QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix were tested for functional absence of:

- Exonucleases
- Endonucleases
- Ribonucleases
- Proteases

(for lot-specific values per 50 µl reaction, see the inside of the kit lid)
 Performance: see application test

Buffer control:
 Conductivity, pH, and performance of buffers and solutions were tested and found to be within the ranges below:

| | Conductivity (mS/cm) | pH | |
|--|----------------------|-----------|-------------------------------------|
| QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x | — | 8.60–8.80 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Performance: see application test | | | |
| Q-Solution, 5x | — | 6.80–7.20 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| RNase-free water | <0.005 | — | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Quantitative determination of cationic components of the QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x. | | | <input checked="" type="checkbox"/> |
| RNase-free water was certified to be free of RNase activity by comparing the degradation of rRNA with a positive control after 3 hours incubation at 37°C. The degradation of rRNA was less than in the positive control which contained 10 pg/ml RNase A. | | | <input checked="" type="checkbox"/> |

Q-Solution:
 Performance in PCR was tested.
 The number of viable aerobic microorganisms present in Q-Solution was tested using membrane filtration and incubation for 3-5 days according to DAB.
 Total Aerobic Microbial Count: ≤ 1TAMC/1 ml

dNTP Mix, 10 mM each:
 Spectrophotometric analysis:

- 260 nm: 425–474 absorbance units/ml
- 250 nm/260 nm: 0.8–0.9
- 280 nm/260 nm: 0.5–0.6

Application test:
 Sensitivity and reproducibility in one-step RT-PCR were tested in parallel 50 µl reactions using 100 pg and 10 pg of human total RNA.

Shipping and storage conditions
 The QIAGEN OneStep RT-PCR Kit is shipped on dry ice and should be stored immediately upon receipt at –15 to –25°C in a constant-temperature freezer. When stored under these conditions and handled correctly, the product can be kept at least until the expiration date (see the inside of the kit lid) without showing any reduction in performance.

Certified by: Al Dedeus Date: 05/07/10
0409/1 (mm/dd/yy)

Lampiran 8
 Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian
 (Sambrook, J., et al., 1989, Ausubel, 2001)

| No | Nama Reagen dan Dapar | Cara Pembuatan |
|----|-----------------------------------|---|
| 1. | Natrium hidroksida 1 N | Sebanyak 4 g natrium hidroksida dilarutkan dalam akuades hingga tepat 100 mL. |
| 2. | Asam klorida 1 N | Sebanyak 8,33 mL larutan asam klorida pekat 12 N ditambahkan akuades hingga tepat 100 mL. |
| 3. | Larutan akrilamid 30 % | Sebanyak 29 g akrilamid dan 1 g dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL. Kemudian larutan disaring dengan menggunakan filter Whatman dengan ukuran pori 0,45 mikron dan disimpan dalam botol kaca yang sudah dilapisi dengan alumunium foil dengan suhu penyimpanan 2-4°C. |
| 4. | Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 50 X | Sebanyak 121 g tris base, 18,6 g Na ₂ EDTA, dan 28,56 ml asam asetat glasial dilarutkan dalam akuabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 8,0 dengan asam asetat 1 N dan tambahkan dengan akuabides hingga 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. |
| 5. | Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 10 X | Sebanyak 60,55 g tris base, 3,77 Na ₂ EDTA dan 30,92 asam borat dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 200 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. |
| 6. | Dapar TAE (Tris Asetat EDTA) 1 X | Sebanyak 10 mL dapar TAE 50 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. |

Lampiran 8 (lanjutan)
 Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian
 (Sambrook, J., et al., 1989, Ausubel, 2001)

| No | Nama Reagen dan Dapar | Cara Pembuatan |
|-----|---|---|
| 7. | Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 1 X | Sebanyak 50 mL dapar TBE 10 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ^o C, tekanan 2 atm, selama 15 menit. |
| 8. | Larutan APS (Ammonium Persulfate) 10% | Sebanyak 10 g ammonium per sulfate dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL. |
| 9. | Larutan stok <i>Crystal Violet</i> 1,6 ug/ul | Sebanyak 32 mg <i>Crystal Violet</i> dilarutkan dalam 20 mL akua demineralisata hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruang. |
| 10. | Larutan gliserol 30 % | Sebanyak 30 mL larutan gliserol 100% ditambahkan akuabides hingga tepat 100 mL. |
| 11. | Larutan EDTA (Etilen Diamin Tetra Acid) 20 mM | Sebanyak 3,7 g Na ₂ EDTA dan 0,4 g NaOH dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 20 mL . Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ^o C, tekanan 2 atm selama 15 menit. |
| 12. | Larutan loading buffer 6 X | Sebanyak 690 ul larutan gliserol 30%, 125 ul larutan stok <i>Crystal Violet</i> , 80 ul larutan EDTA 20 mM dilarutkan dengan larutan buffer TAE 1x hingga tepat 2 mL. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ^o C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Larutan disimpan pada suhu 2-8 ^o C. |
| 13. | Larutan PBS (<i>Phospate Buffered Saline</i>) 1 X | Sebanyak 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ dan 0,24 g KH ₂ PO ₄ dilarutkan dalam 800 mL akuabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 7,4 dan ditambahkan dengan akuabides hingga 1000 mL. |

Lampiran 8 (lanjutan)
 Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian
 (Sambrook, J., et al., 1989, Ausubel, 2001)

| No | Nama Reagen dan Dapar | Cara Pembuatan |
|-----|------------------------------------|---|
| 14. | Larutan Trypan Blue 10 X | Sebanyak 200 mg Trypan Blue dilarutkan dalam PBS hingga tepat 50 mL. |
| 15. | Larutan dNTP <i>mix</i> 10 mM | Sebanyak 5 ul dATP 100 mM, 5 ul dTTP 100 mM, 5 ul dCTP 100 mM dan 5 ul dGTP 100 mM ditambahkan air bebas nuklease hingga volume akhirnya 50 ul. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-4°C. |
| 16. | Larutan RNase Inhibitor | Sebanyak 5 ul larutan stok RNase Inhibitor ditambahkan 5 ul air bebas nuklease. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-4°C |
| 17. | Larutan Dapar TE (Tris EDTA) 1/3 X | Sebanyak 333 ul dapar TE 1x dilarutkan dengan air bebas nuklease hingga volume akhirnya tepat 1000 ul. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |
| 18. | Larutan Stok Primer SOX2 F 500 uM | Sebanyak 156,4 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lyophilized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |
| 19. | Larutan Stok Primer SOX2 R 500 uM | Sebanyak 93,8 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lyophilized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |
| 20. | Larutan Stok Primer c-Myc F 500 uM | Sebanyak 85,2 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lyophilized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |

Lampiran 8 (lanjutan)
Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian

| No | Nama Reagen dan Dapar | Cara Pembuatan |
|-----|---------------------------------------|--|
| 21. | Larutan Stok Primer c-Myc R 500 uM | Sebanyak 125 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pemipetan dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |
| 22. | Larutan Stok Primer PUM 1 F 500 uM | Sebanyak 77,6 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pemipetan dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |
| 23. | Larutan Stok Primer PUM 1 R 500 uM | Sebanyak 54,6 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pemipetan dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C. |