

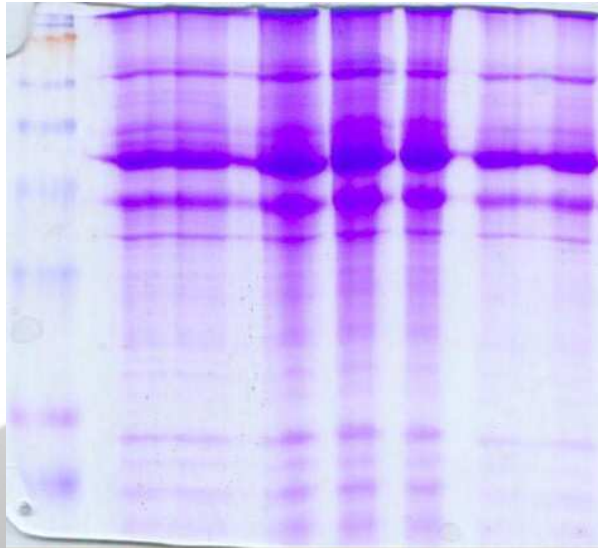
BAB 5 HASIL PENELITIAN

Sel galur HSC-3 dan HSC-4 yang telah dikultur dan jaringan mukosa mulut normal dilakukan purifikasi (ekstraksi) protein dengan menggunakan kit Trizol (Invitrogen) sesuai dengan petunjuk produk. Konsentrasi total protein diukur dengan menggunakan Bradford Protein Assay. Protein standar yang digunakan dalam analisis Bradford adalah *Bovine Serum Albumine* (BSA) dengan konsentrasi 1024 µg/ml, 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8µg/ml. Selanjutnya, dilakukan elektroforesis protein menggunakan SDS-PAGE untuk melihat profil protein target, hTERT, berdasarkan berat molekulnya.

Visualisasi protein dan penentuan berat molekul yang terdapat pada *gel* dianalisis menggunakan Gel Doc 2000 dengan program Quantity One (BioRad). *Gel* yang telah dilarikan dimasukkan ke dalam Gel Doc 2000 dan diambil gambarnya dengan menggunakan sumber cahaya *white light (epi-white)*. Mode *epi-white* digunakan untuk sampel yang mampu memantulkan dan menyebarkan cahaya. Dengan menggunakan mode ini, data akan diukur dalam *uncalibrated optical density (uOD) units*.⁵² Semakin tinggi uOD akan menggambarkan *opacity* yang makin meningkat.⁵³ Kemampuan bagian *gel* untuk memantulkan cahaya akan dianggap sebagai pita protein dengan densitas minimal tertentu.⁵² Densitas minimal yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dengan pengaturan awal program Quantity One. Pita yang terdapat pada letak tertentu akan dibandingkan dengan pita standar protein, sehingga berat molekul protein dapat diperkirakan.⁵²

Protein marker yang digunakan adalah SeeBluePlus2 (Invitrogen) yang memiliki efektifitas dalam menentukan berat molekul antara 3 kD dan 188 kD dalam SDS-PAGE. Protein hTERT dalam SDS-PAGE tampak dengan berat molekul 127 kD yakni diantara pita pertama (biru, 188 kD) dan pita ke-dua (oranye, 98 kD) pada *protein marker*. Dalam penelitian ini, yang diperkirakan sebagai protein hTERT adalah protein yang memiliki berat molekul diantara 117 kD dan 137 kD dari hasil analisis menggunakan program Quantity One (BioRad).

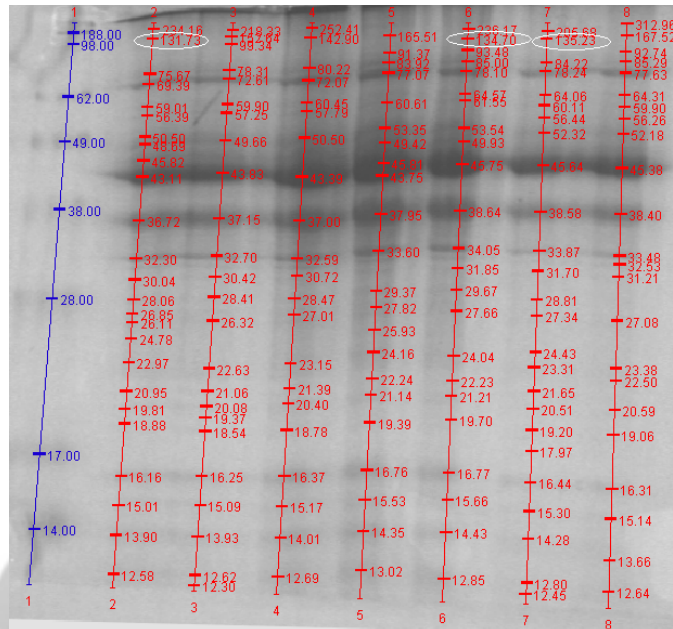
5.1 Profil Protein hTERT pada Sel Galur HSC-3



Gambar 5.1 Hasil Scan Gel Sel Galur HSC-3

Pada gel sel galur HSC-3, terdapat 8 lajur. Dari kiri ke kanan, lajur pertama merupakan *protein marker*. Lajur ke-dua hingga ke-delapan merupakan protein sel galur HSC-3 yang berasal dari cawan kultur yang sama dan perlakuan yang sama. Sampel protein dimasukkan dengan volume 15 μ l sedangkan pada lajur 2, 3, 7, dan 8, sampel protein yang dimasukkan sebanyak 7,5 μ l. Sehingga pada lajur sampel 2, 3, 7, dan 8 tampak kurang tebal dari pada lajur sampel 4,5, dan 6.

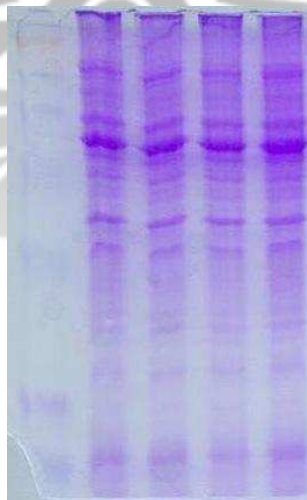
Protein marker yang berwarna biru dan oranye terlihat dengan jelas, namun jaraknya sangat dekat. Dengan visualisasi langsung, pita protein sampel yang berada sejajar dengan protein marker diantara 98 kD dan 188 kD, terlihat tipis.



Gambar 5.2 Hasil Analisis Gel protein sampel HSC-3 dengan menggunakan program Quantity One. Angka dengan warna biru menunjukkan berat molekul protein marker (standar) dan yang berwarna merah menunjukkan berat molekul yang diperkirakan.

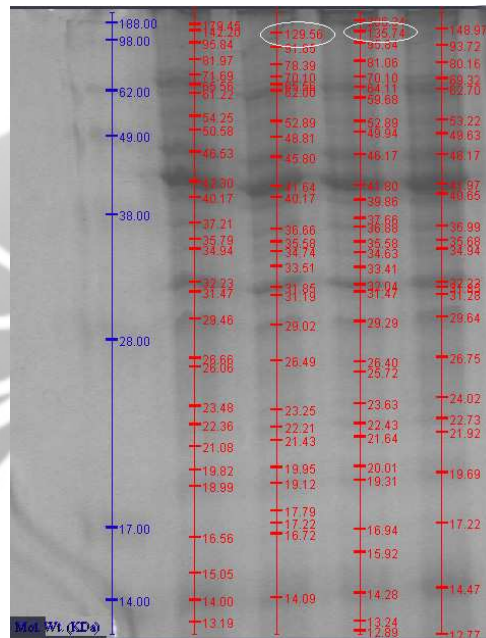
Dengan menggunakan program Quantity One, tampak 3 pita yang sesuai dengan kualifikasi yakni pita protein pada lajur 2 (131,72 KD), 6 (134,7 kD), dan 7 (135,23 kD). Secara garis besar, pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT terlihat tipis.

5.2 Profil Protein hTERT pada Sel Galur HSC-4



Gambar 5.3 Hasil scan gel sel galur HSC-4. Dari kiri ke kanan, lajur pertama merupakan protein marker (Invitrogen SeeBluePlus2), lajur 2, 3, 4, 5 adalah sampel HSC-4

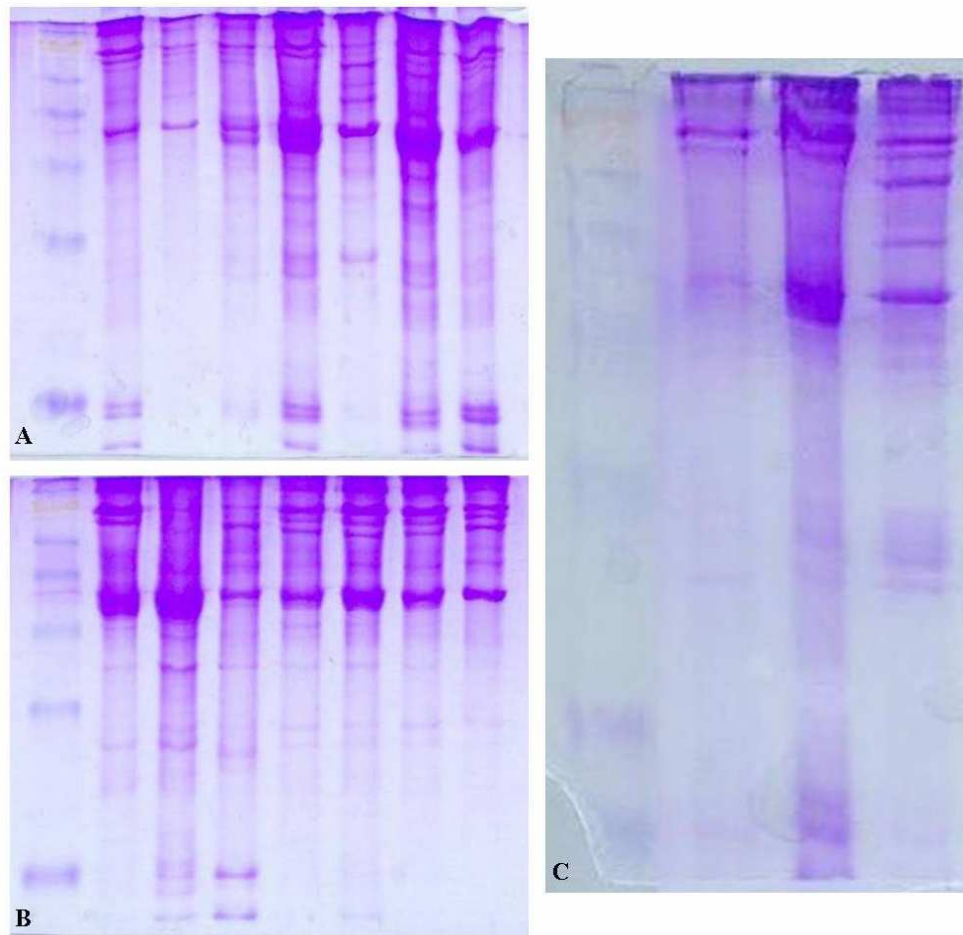
Pita *protein marker* pada gel sel galur HSC-4 terlihat samar. Sulit untuk membandingkan pita protein sampel HSC-4 dengan pita *protein marker*, dikarenakan tidak terlihatnya pita protein yang diperkirakan sebagai hTERT. Berbeda dengan sampel protein HSC-3, sampel protein HSC-4 tampak homogen karena tidak ada perbedaan volume sampel protein yang dilarikan pada masing-masing lajur yaitu 15 μ l.



Gambar 5.4 Hasil Analisis Gel protein sampel HSC-4 menggunakan program Quantity One.

Dari empat lajur sampel protein yang dilarikan, hanya terlihat dua pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT, yaitu pada lajur 3 (129,56 kD) dan lajur 4 (135,74 kD). Pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT sangat tipis.

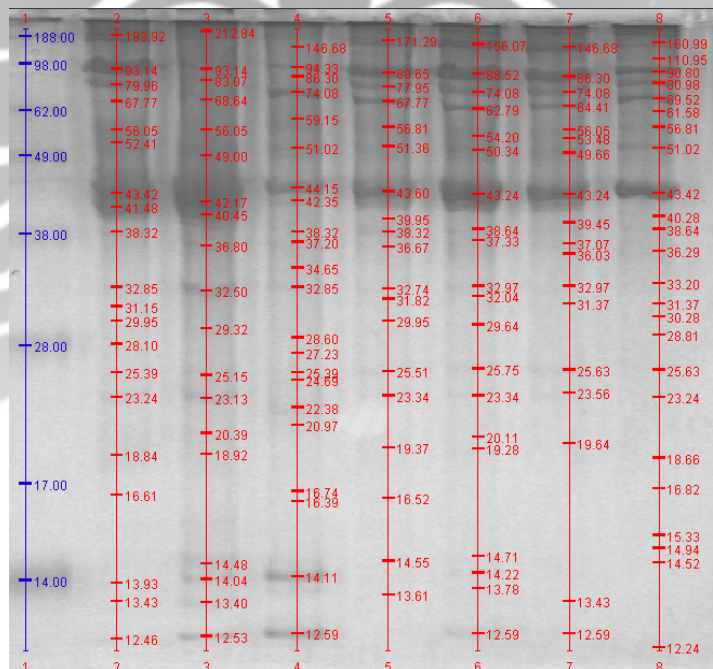
5.3 Profil Protein hTERT pada Jaringan Mukosa Sehat



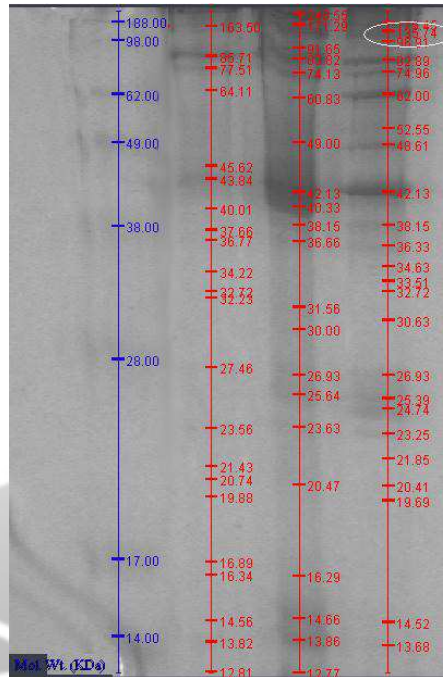
Gambar 5.5 Hasil scan gel jaringan mukosa normal. (A) Sampel gingiva no 2, 3, 4, 5, 8, 9 dan 10. (B) Sampel gingiva no. 11, 12, 16, 17, 18, 19, dan 20. (C) Sampel gingiva no. 21, 25, dan 27. Dari ketiga gambar, lajur paling kiri merupakan protein marker.



Gambar 5.6 Hasil Analisis Gel protein sampel jaringan mukosa sampel no 2, 3, 4, 5, 8, 9, dan 10 (dari kiri ke kanan setelah protein marker: no. 2, 3, 4, 5, 8, 9, dan 10) dengan menggunakan program Quantity One. Terdapat satu pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT yaitu pada sampel no. 5 (lajur ke5).



Gambar 5.7 Hasil Analisis Gel protein sampel jaringan mukosa sampel no 11, 12, 16, 17, 18, 19, dan 20, (dari kiri ke kanan setelah protein marker: no. 11, 12, 16, 17, 18, 19, dan 20) dengan menggunakan program Quantity One. Tidak tampak pita yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT.



Gambar 5.8 Hasil Analisis gel protein sampel jaringan mukosa sampel no. 21, 25, dan 27 (dari kiri ke kanan setelah protein marker: no. 21, 25, dan 27) dengan menggunakan program Quantity One. Terdapat satu pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT yaitu pada sampel no. 27 (lajur ke4).

Dari 17 sampel protein jaringan normal yang dilarikan dalam SDS-PAGE, hanya terdapat 2 pita protein yang diperkirakan sebagai pita protein hTERT, yaitu pada protein sampel no. 5 (gambar 5.6) dan 27 (gambar 5.8).

Tabel 5.1 menunjukkan keberadaan protein yang diperkirakan sebagai protein hTERT dan tingkat ekspresi protein hTERT yang dilakukan secara visualisasi langsung.

Tabel 5.1 Keberadaan protein yang diperkirakan sebagai protein hTERT dan tingkat ekspresi protein.

Sampel Protein	No. Sampel	Berat molekul protein yang diperkirakan sebagai protein hTERT (kD)*	Tingkat ekspresi protein hTERT**
HSC-3	2***	131.732	Tipis (1)
	6	134.697	Tidak terlihat (0)
	7***	135.229	Tipis (1)
HSC-4	3	129.563	Tidak terlihat (0)
	4	135.735	Tipis (1)
Jaringan Mukosa Normal	5	130.09	Tipis (1)
	27	135.735	Sedang (2)

*Berat Molekul dianalisis dengan menggunakan program Quantity One (BioRad)

**Hasil visualisasi langsung dengan pemeriksaan interpersonal

***Protein yang dilarikan dengan volume 7,5 μ l, setengah dari volume sampel yang lain.



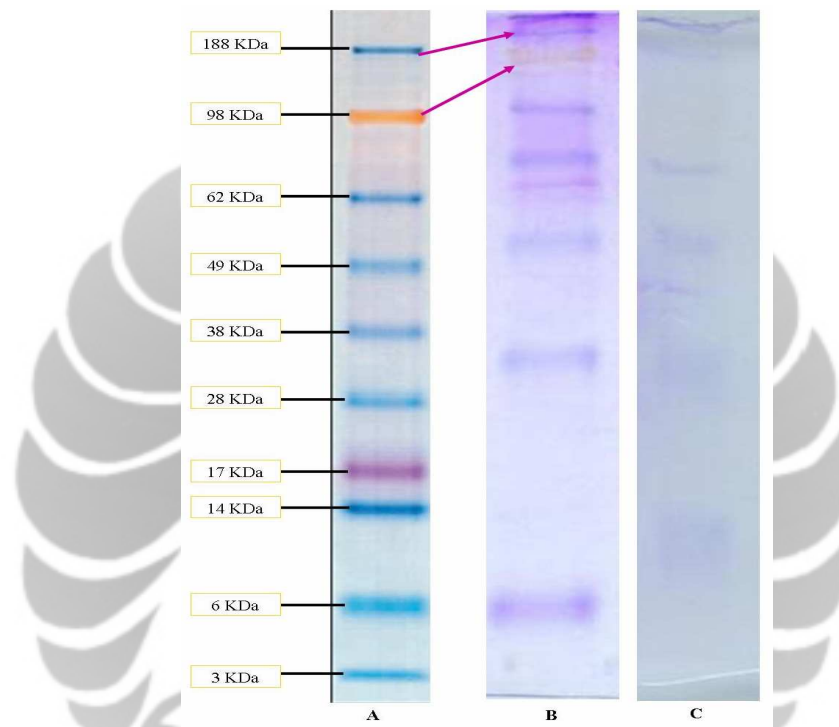
BAB 6 PEMBAHASAN

Protein adalah produk gen yang merupakan penyusun material sel dan memiliki fungsi regulasi sel. Adanya ekspresi protein menunjukkan aktivitas gen yang sedang aktif. Protein hTERT merupakan molekul kunci enzim telomerase yang dapat teraktivasi oleh adanya onkogen dan ditekan oleh *tumor suppressor gene*.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat profil protein hTERT pada sel galur KSSRM dan jaringan mukosa mulut normal menggunakan metode SDS-PAGE yang memisahkan protein berdasarkan berat molekulnya. Untuk itu, protein sel galur KSSRM dan protein jaringan mukosa normal yang telah diekstraksi dilarikan dalam wadah elektrik sehingga protein akan menempati posisi tertentu di dalam gel dan nampak sebagai pita setelah diwarnai dengan *Coomassie Blue*. Lokasi pita protein sampel akan dibandingkan dengan lokasi pita *protein marker*, sehingga berat molekul protein sampel tersebut dapat diperkirakan.⁵² Protein hTERT dalam SDS-PAGE tampak dengan berat molekul 127 kD. Dalam penelitian ini, yang dianggap termasuk sebagai protein hTERT adalah protein yang diperkirakan memiliki berat molekul diantara 117 KDa dan 137 KDa berdasarkan visualisasi langsung dan penentuan berat molekul menggunakan program Quantity One (BioRad).

Dalam melakukan penelitian ini ditemukan beberapa kendala, khususnya dalam memperkirakan berat molekul menggunakan protein marker Invitrogen SeeBluePlus2. Protein marker Invitrogen SeeBluePlus2 memiliki kemampuan untuk memperkirakan berat molekul sampel dengan rentang 3 sampai 188 kD di dalam SDS-PAGE. Protein hTERT berada di antara pita protein marker yang berwarna oranye (98 kD) dan pita protein marker yang pertama (188 kD). Jika dibandingkan dengan rentang berat molekul lainnya, rentang berat molekul antara 98 kD dan 188 kD merupakan rentang yang paling jauh (dengan selisih 90 KDa) dengan jarak antara pita yang cukup dekat (Gambar 6.1 (B)). Hal ini pernah

disiasati dengan melarikan gel dengan lebih lama supaya rentang 98 - 188 kD menjadi lebih jauh dan pembacaan diharapkan menjadi lebih akurat. Namun nampaknya hal ini menyebabkan protein yang dilarikan menjadi terdegradasi. Arus yang dilarikan dalam waktu yang lama, pada akhirnya akan menyebabkan panas. Temperatur yang tinggi dapat menyebabkan protein menjadi terdegradasi, sehingga *protein marker* menjadi tidak terlihat⁵⁴ (Gambar 6.1 (C)).



Gambar 6.1 Perbandingan kualitas protein marker. (A) Gambaran protein marker Invitrogen SeeBluePlus2 yang ditampilkan di dalam catalog Invitrogen, (B) Gambaran protein marker Invitrogen SeeBluePlus2 yang dilarikan dalam SDS-PAGE selama 2 jam yang digunakan dalam penelitian ini, (C) Gambaran protein marker Invitrogen SeeBluePlus2 yang dilarikan selama 3 jam. Protein marker menjadi tidak terlihat dan terjadi kesulitan dalam penentuan standar protein.

Dengan menggunakan program Quantity One, penelitian ini memperlihatkan bahwa HSC-3 (3 dari 8 lajur), HSC-4 (2 dari 4 lajur), dan 2 dari 17 sampel protein gingiva mengekspresikan protein hTERT. Namun visualisasi langsung protein hTERT pada HSC-3 dan HSC-4 secara umum terlihat tipis, pada salah satu protein sampel jaringan mukosa normal tampak tipis dan sementara satu

protein sampel jaringan mukosa normal lainnya tampak tebal. Tebal dan tipisnya (kuantitas) pita protein tidak dapat dibandingkan satu sama lain karena konsentrasi protein yang dilarikan berbeda-beda.

Protein hTERT yang tampak pada sampel sel galur HSC-3 dan HSC-4 sesuai dengan pernyataan dari berbagai literatur bahwa sebagian besar sel kanker terdapat aktivitas telomerase.²⁷ Mutasi pada p53 menyebabkan protein p53 tidak dapat menjalankan fungsi normalnya sebagai penekan hTERT. Berbeda dengan sel kanker, pada sel somatik normal umumnya tidak terdapat aktivitas telomerase (hTERT).⁴⁰

Jaringan mukosa normal terdiri dari jaringan epitel, jaringan ikat, pembuluh darah dan pembuluh saraf. Telomerase diekspresikan pada sel progenitor gamet (sel reproduksi dewasa)^{33, 34} kecuali sel proliferasif dari jaringan yang memperbarui diri (sel sumsum tulang, sel basal epidermis, endometrium proliferasif dan sel kelenjar usus).³³ Adanya ekspresi hTERT yang terdeteksi pada jaringan mukosa normal di dalam penelitian ini diperkirakan karena adanya sel keratinosit dan hematopoietik yang terdapat pada darah.⁴² Sel keratinosit adalah sel utama yang terdapat pada jaringan gingiva⁴³ sedangkan sel hematopoietik adalah sel yang diisolasi dari darah atau sumsum tulang yang dapat memperbarui dirinya sendiri, dapat berdiferensiasi menjadi berbagai variasi sel, dapat mobilisasi dari sum sum tulang ke darah sirkulasi, dan dapat mengalami apoptosis.⁵⁵ Berdasarkan penelitian pada sumsum tulang, telomerase ditemukan pada sumsum tulang yang normal dan ganas, hal ini menunjukkan bahwa keberadaan telomerase tidak terbatas pada sel yang imortal.⁵⁶