

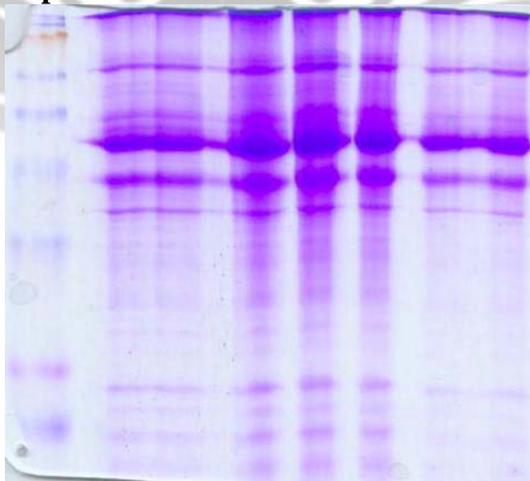
BAB 5 HASIL PENELITIAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini, berupa sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut tipe HSC-3 dan HSC-4 serta jaringan mukosa mulut normal. Penelitian diawali dengan pengumpulan sampel mukosa mulut normal berupa gingiva normal yang terbuang dari pasien yang menjalani tindakan odontektomi di Klinik Bedah Mulut RSGM-P FKG UI dan mengkultur sel galur KSSRM HSC-3 dan HSC-4.

Sampel yang dipakai didasarkan pada nilai normal yang didapat dari hasil *Bradford Protein Assay*. Protein dengan nilai kuantitas yang tidak masuk kategori normal dalam Bradford protein assay tidak disertakan dalam tahap SDS PAGE. Sampel yang sudah dimasukkan ke gel SDS PAGE dilarikan pada 100 V pada 30 menit kemudian dilanjutkan dengan tegangan 200 V. Gel yang didapatkan memiliki standar protein 188 KDa-14 KDa.

Protein p73 terletak di antara protein standar dengan berat molekul 70-80 KDa. Penentuan berat molekul dari profil protein pada gel SDS PAGE dilihat lebih spesifik menggunakan Gel Doc 2000, program BioRad Quantity One (tabel 5.1).

5.1 Profil protein p73 pada Sel Galur HSC-3



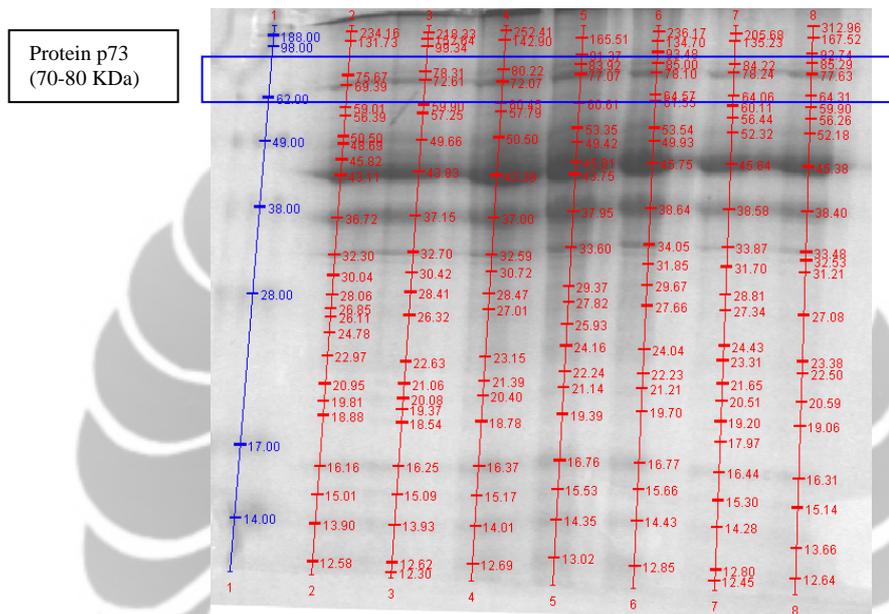
Gambar 5.1.1 Scan gel SDS PAGE protein sel galur HSC-3

Keterangan: dari kiri ke kanan lajur 1- lajur 8

Lajur 1 = Standar Protein SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

Lajur 2-8 = HSC-3*

*Lajur 2 dan 3 serta Lajur 7 dan 8 merupakan 1 sampel protein yang terbagi menjadi dua saat proses memasukkan sampel protein ke stacking gel, sehingga masing-masing konsentrasi pada lajur tersebut menjadi setengah dari yang seharusnya.

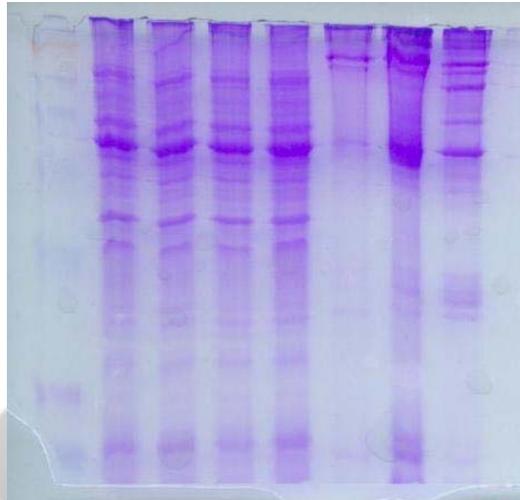


Gambar 5.1.2. Berat Molekul dari Tiap Pita Protein HSC-3 (BioRad Quantity One)

Pada lajur ke 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 (HSC-3), nampak jelas bahwa protein p73 diekspresikan dengan intensitas yang cukup tinggi, atau memiliki pita yang tebal hingga dapat dilihat secara kasat mata.

Pada lajur ke 2, protein p73 diidentifikasi memiliki berat molekul 75, 67 oleh Quantity One. Tidak seperti pita protein p73 pada lajur lain, pita protein p73 tersebut memiliki intensitas yang kurang. Kemungkinan besar hal ini dipengaruhi oleh posisi lajur ke dua yang lebih rendah daripada lajur lainnya.

5.2 Profil Protein p73 pada Sel Galur HSC-4 dan mukosa normal



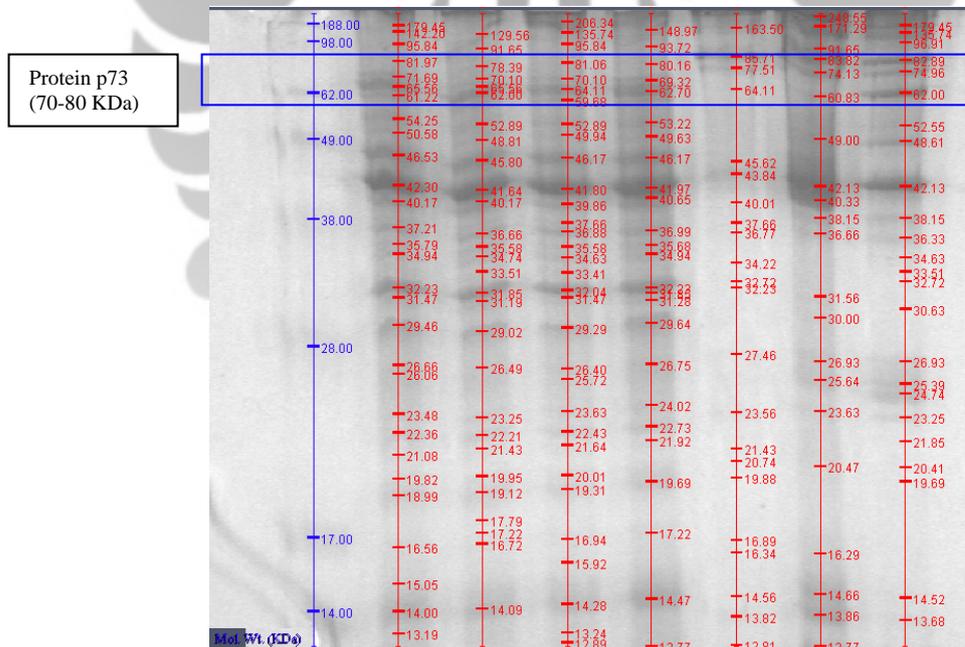
Gambar 5.2.1 scan gel SDS PAGE protein sel galur HSC-4 dan gingiva normal

Keterangan:dari kiri ke kanan lajur 1- lajur 8

Lajur 1 = Standar Protein SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

Lajur 2-5 = HSC-4

Lajur 6-8 = sampel gingiva no 21, 25 dan 27

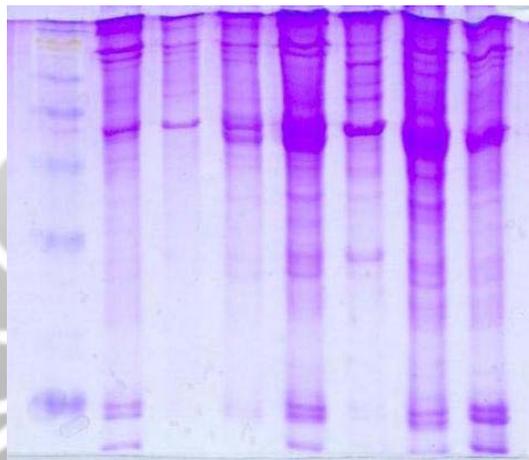


Gambar 5.2.2. Berat Molekul Dari Tiap Pita Protein HSC-4 dan Mukosa Normal (Biorad Quantity One)

Pada lajur ke 2, 3, 4, dan 5 (HSC-4) nampak bahwa ekspresi protein p73 relatif rendah pada HSC-4 dikarenakan pita protein yang ada relatif tipis.

Pada lajur ke 6, 7, dan 8 (gingiva no.21, 25 dan 27), protein p73 terletak pada pita ke 2 dari standar protein 98 KDa dan memiliki level ekspresi yang cukup tinggi dibandingkan dengan HSC-4 ditinjau dari ketebalan pita proteinnya.

5.3 Profil Protein p73 pada Mukosa Normal

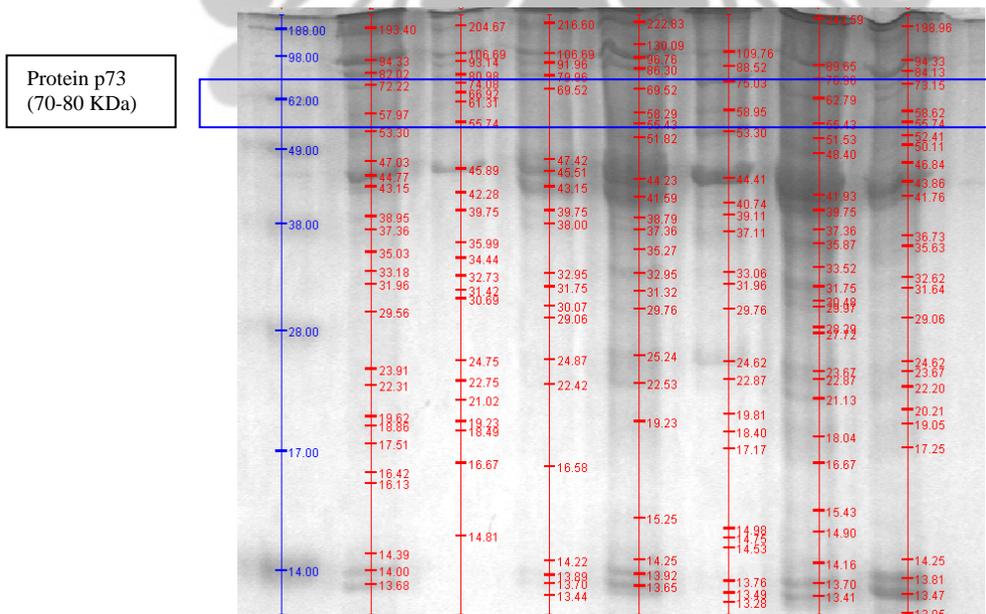


Gambar 5.3.1. Scan Gel SDS PAGE Protein Gingiva Normal

Keterangan: dari kiri ke kanan lajur 1- lajur 8

Lajur 1 = Standar Protein SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

Lajur 2-8 = sampel gingiva no 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10

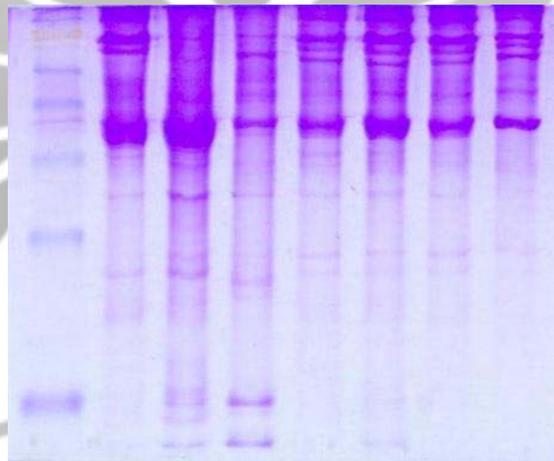


Gambar 5.3.2. Berat Molekul dari Tiap Pita Protein Mukosa Normal (BioRad Quantity One)

Pada lajur ke 3 (gingiva no.3), protein p73 tidak terlihat secara kasat mata, namun terdeteksi oleh Quantity One dengan berat molekul 74,08 KDa. Protein p73 tidak terdeteksi pada lajur ke 5 (gingiva no.5).

Pita protein p73 menunjukkan intensitas ketebalan yang tinggi pada lajur ke 6 (gingiva no. 8), sementara pada Pada lajur ke 2, 4, 7, dan 8 (gingiva no.2, 4, 9, dan 10) pita protein p73 menunjukkan ketebalan yang sedang Sedangkan pada lajur ke 5 ketebalan pita protein p73 tidak mencukupi untuk dilihat secara kasat mata.

5.4 Profil Protein p73 pada Mukosa Normal

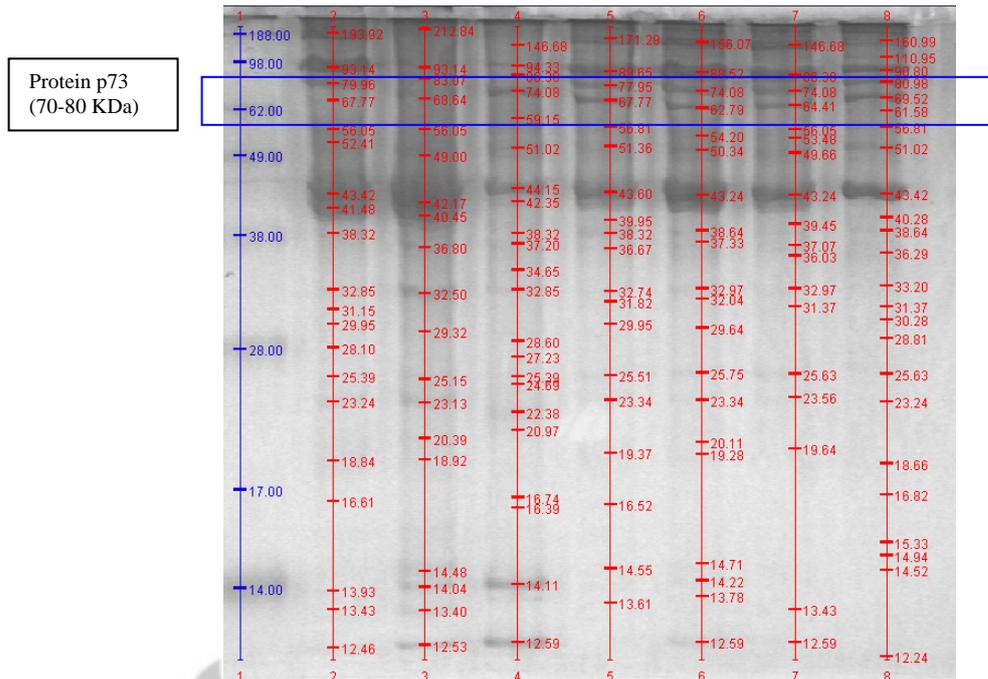


Gambar 5.4.1 Scan Gel SDS PAGE Protein Mukosa Normal

Keterangan: dari kiri ke kanan lajur 1- lajur 8

Lajur 1 = Standar Protein SeeBlue Plus2 (Invitrogen)

Lajur 2-8 = sampel gingiva no 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20



5.4.2. Berat Molekul dari Tiap Pita Protein Gingiva (Biorad Quantity One)

Pada lajur ke 2, 4, 5, 6, dan 7 (gingiva no.11, 17,18,19) protein p73 terlihat sebagai pita yang tebal. Sementara, tidak terlihat protein p73 pada lajur ke 3 dan 8 (gingiva no.12 dan 20). Berdasarkan ketebalan pita protein p73 secara kasat mata, nampak bahwa protein p73 pada sampel gingiva ini diekspresikan dalam level yang cukup tinggi.

Tabel 5.1 Nilai Protein P73 dari Masing-Masing Sampel Protein

No	Lajur pada SDS PAGE	Sampel	Keberadaan Protein p73	Berat Molekul protein p73 (KDa)*	Tingkat Ekspresi Protein p73**
					nilai
1	2	HSC-3	+	75.665	Tebal
	3				
2	4	HSC-3	+	72.07	Tebal
3	5	HSC-3	+	77.069	Tebal
4	6	HSC-3	+	78.103	Tebal
5	7	HSC-3	+	78.242	Tebal
	8				
6	2	HSC-4	+	71.686	Sedang
7	3	HSC-4	+	70.103	Tidak terlihat
8	4	HSC-4	+	70.103	sedang
9	5	HSC-4	-	-	-
10	2	GGV 2	+	72.222	Sedang
11	3	GGV 3	+	74.083	Tidak terlihat
12	4	GGV 4	+	79.957	Sedang
13	5	GGV 5	-	-	-
14	6	GGV 8	+	75.031	Tebal
15	7	GGV 9	+	76.964	Sedang
16	8	GGV 10	+	73.146	Sedang
17	2	GGV 11	+	79.957	Tebal
18	3	GGV 12	-	-	-
19	4	GGV 16	+	74.083	Tebal
20	5	GGV 17	+	77.949	Tebal
21	6	GGV 18	+	74.083	Tebal
22	7	GGV 19	+	74.083	Tebal
23	8	GGV 20	-	-	-
24	6	GGV 21	+	77.515	Sedang
25	7	GGV 25	+	74.129	Tebal
26	8	GGV 27	+	74.961	Tebal

* berat molekul yang terdeteksi oleh Gel Doc 2000

** tingkat ekspresi ditentukan berdasarkan ketebalan pita protein yang terlihat secara kasat mata.

Profil protein p73 pada HSC-3:

Berdasarkan ketebalan pita protein, seluruh protein p73 pada HSC-3 diekspresikan dengan cukup tinggi . Terlihat pita protein tebal pada daerah 70-80 KDa.

Profil protein p73 pada HSC-4:

Berdasarkan ketebalan pita protein, protein p73 diekspresikan relatif rendah pada HSC-4, sesuai dengan pita protein yang terlihat kurang tebal (sedang). Adanya variasi pada hasil visualisasi gel dengan Gel Doc kemungkinan disebabkan oleh posisi sampel pada lajur SDS PAGE, sehingga variasi tersebut tidak berarti karena sampel yang digunakan berasal dari sel galur yang sama.

Profil protein p73 pada Jaringan Mukosa Normal (n=17):

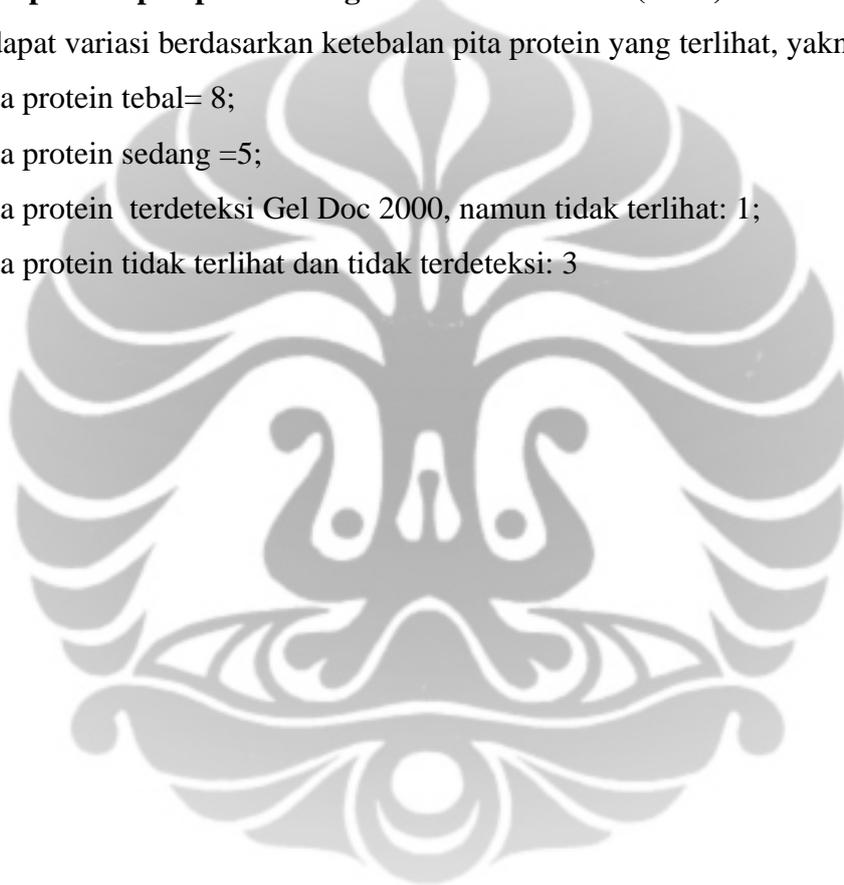
Terdapat variasi berdasarkan ketebalan pita protein yang terlihat, yakni

n pita protein tebal= 8;

n pita protein sedang =5;

n pita protein terdeteksi Gel Doc 2000, namun tidak terlihat: 1;

n pita protein tidak terlihat dan tidak terdeteksi: 3



BAB 6 PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil protein p73 pada sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut HSC-3 dan HSC-4 serta mukosa normal. Menurut literatur, setiap protein dan isoform dari p73 diekspresikan pada level yang berbeda tergantung pada jenis jaringan dan tahap perkembangannya¹¹, ekspresi p73 pada kanker sangat bervariasi dan beberapa sel galur dan sel tumor primer mengekspresikan p73 pada level yang mudah dideteksi. (Stiewie dan Putzer, tidak dipublikasikan)^[31]. Gen p73 juga diekspresikan pada seluruh jaringan normal, meskipun pada level yang sangat rendah¹¹.

Berdasarkan data yang diperoleh, protein p73 terdeteksi pada seluruh sel galur HSC-3 dan sel galur HSC-4. Selain itu, Protein p73 juga terdeteksi pada sebagian besar jaringan mukosa normal yang diamati (14/17). Intensitas protein p73 yang diekspresikan pada sampel ditentukan berdasarkan ketebalan pita protein pada daerah dengan berat molekul antara 70-80 KDa yang nampak pada gel SDS PAGE.

Pada sel galur HSC-3, kebanyakan pita protein p73 nampak jelas sebagai garis tebal di daerah standar protein 70-80 KDa. Sementara pada sel galur HSC-4, pita protein yang menunjukkan keberadaan protein p73 terlihat sebagai garis dengan ketebalan sedang pada daerah standar protein 70-80 KDa. Dengan demikian, ekspresi protein p73 tampak lebih rendah pada HSC-4 dinilai dari ketebalan pita protein p73 pada gel SDS PAGE.

Pada sampel protein jaringan mukosa normal berupa gingiva (n=17), ekspresi protein p73 menunjukkan adanya variasi berdasarkan ketebalan pita yang nampak. Delapan buah sampel gingiva normal menunjukkan pita protein p73 yang tebal, lima buah menunjukkan ketebalan yang cukup, satu sampel dengan protein p73 tak terdeteksi secara kasat mata namun mampu dideteksi oleh Gel Doc 2000, Quantity One. Dari seluruh sampel gingiva yang diperiksa (n=17) hanya 3 buah sampel yang tidak memiliki protein p73 baik secara kasat mata maupun dengan Gel Doc 2000.

Ekspresi protein menunjukkan aktivitas gen yang aktif. Hasil pengamatan melalui SDS PAGE menunjukkan ekspresi protein p73 yang lebih tinggi pada HSC-3 dibandingkan dengan HSC-4. Kemungkinan hal ini berkaitan dengan teori bahwa protein p53 pada HSC-3 berada pada level yang sangat rendah sehingga protein p73 yang memiliki sifat proapoptosis pada isoform TAp73 dapat lebih terekspresikan. Sementara pada HSC-4, protein p53 diketahui diekspresikan pada level yang cukup tinggi sehingga p73 yang juga memiliki sifat *tumor suppressor* tidak begitu terekspresikan.

Hal ini juga sejalan dengan teori bahwa HSC-4 memiliki polimorfisme nukleotida tunggal pada kodon 72(R) yang mengkode arginine sehingga mutan p53 berikatan lebih kuat dengan p73 dan menginaktivasinya.⁽²⁴⁾ Namun, berdasarkan hasil tersebut, perlu dipertimbangkan juga mengenai kompleksitas dari gen p73 yang memiliki beberapa isoform protein melalui mekanisme *alternative splicing* yang salah satu produk proteinnya merupakan molekul anti apoptosis.^[31]

Gen p73 mengkode protein pro dan anti apoptosis sekaligus, yakni TAp73 dan $\Delta Np73$.^[7] Dalam menilai tingkat ekspresi gen p73 pada level protein sebaiknya juga memperhatikan ekspresi relatif dari kedua isoform tersebut, sebab ada tumor yang memperlihatkan ekspresi p73 yang tinggi dan ada pula yang memperlihatkan ekspresi p73 yang rendah, hal ini dimungkinkan oleh efek dari masing-masing isoform yang berbeda. Pada penelitian ini, tidak dilakukan pemeriksaan protein p73 dengan *reagent* yang dapat memisahkan bentuk TA dan bentuk N, sehingga perlu diteliti lebih lanjut mengenai level ekspresi isoform TAp73 dan $\Delta Np73$ pada kedua sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

Berdasarkan literatur, pola ekspresi protein p73 lebih tinggi pada jaringan epitel dibandingkan jaringan lain dikarenakan p73 memiliki spesifikasi peran pada jaringan tersebut^{(11) (5)}. Hal ini juga terlihat pada epitel rongga mulut yang diperoleh dari spesimen gingiva normal pada penelitian ini, dimana 82% spesimen (14/17) yang diteliti menampakkan ekspresi protein p73 yang mudah dideteksi. Dari jumlah tersebut, mayoritas ekspresi p73 berada pada tingkat yang cukup tinggi. Namun perlu diperhatikan bahwa sampel

yang digunakan pada penelitian ini tidak dalam populasi epitel yang homogen karena berasal dari gingiva yang memiliki berbagai jenis sel. Sehingga diperlukan evaluasi lebih lanjut menggunakan sampel dengan populasi epitel mulut yang homogen untuk memastikan kebenaran tingkat ekspresi p73 dari hasil penelitian ini.

