



UNIVERSITAS INDONESIA

**KO-KULTUR SEL PUNCA KANKER PAYUDARA MANUSIA
DENGAN *MOUSE EMBRYONIC FIBROBLAST* (MEF)
UNTUK MEMPERTAHANKAN PLURIPOTENSI
SEL PUNCA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

**LIZA TIARA
0706264791**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**KO-KULTUR SEL PUNCA KANKER PAYUDARA MANUSIA
DENGAN *MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS* (MEF)
UNTUK MEMPERTAHANKAN PLURIPOTENSI
SEL PUNCA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

**LIZA TIARA
0706264791**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

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 : Liza Tiara
NPM : 0706264791
Tanda tangan : 
Tanggal : Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Liza Tiara
NPM : 0706264791
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Ko-Kultur Sel Punca Kanker Payudara Manusia dengan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) untuk Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

Telah berhasil dipertahankan dihadapan 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. Amarila Malik, M.Si

()

Pembimbing II : Aroem Naroeni, DEA., PhD

()

Penguji I : Dr. Maksum Radji, M. Biomed

()

Penguji II : Dr. Arry Yanuar, M.S

()

Penguji III : Santi Purna Sari, M.Si

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 1 Juli 2011

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. Dr. Amarila Malik, M.Si, 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.
2. Ibu Aroem Naroeni, DEA., Ph.D, selaku pembimbing II, yang telah memberikan 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.
3. Tim Peneliti Unggulan Genom UI 2009-2012 (dr. Budiman Bela, Dr.rer.physiol. dr. Septelia I. Wanadi, drg. Endang W. Bachtiar, PhD, Dr. Amarila Malik, Apt., MSi., Drs. Bambang Wispriyono, Apt., PhD. Dan Aroem Naroeni, DEA., Ph.D) yang telah mempercayai pengerjaan sebagian riset Hibah-UI nya kepada saya.
4. Bapak Dr. Iskandarsyah, M.S., Apt., selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan pikiran yang sangat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga saya dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.

6. 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.
7. Kedua orang tua (Ayahanda Zakaria Ali, S.Pt. dan Ibunda Ir. Nurleli Mahyidin MP), adik (Rizki Amalia dan Melita Nadya) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini.
8. Sahabat-sahabat saya, Citra, Offi, dan Arif yang telah berjuang bersama saya selama perkuliahan, Nisa, Krisna dan Kiki yang telah menjadi tempat saya berbagi suka dan duka selama penelitian, Kak Aulia Ornella, sebagai rekan kerja, yang telah banyak sekali membantu saya dalam menyelesaikan skripsi ini, Kak Nia, Kak Alyd dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

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

Jakarta, Juni 2011

Penulis

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

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

Nama : Liza Tiara
NPM : 0706264791
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Ko-Kultur Sel Punca Kanker Payudara Manusia dengan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) untuk Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

berserta 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: Jakarta

Pada tanggal: Juli 2011

Yang menyatakan



Liza Tiara

ABSTRAK

Nama : Liza Tiara
Program Studi : Farmasi
Judul : Ko-kultur sel punca kanker payudara manusia dengan *mouse embryonic fibroblast* (MEF) untuk mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara.

Isolasi dan ekspansi sel punca kanker payudara secara *in vitro* tanpa menghilangkan sifat pluripotensi sel sangat diperlukan untuk mempelajari karakteristik sel punca kanker payudara. Penelitian ini bertujuan untuk mencari suatu kondisi kultur terbaik dengan sistem ko-kultur untuk mempertahankan sifat pluripotensi. Sel tersebut diko-kultur dengan *feeder layer* yang terbentuk dari *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF). Pengukuran ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- menggunakan metode spektrofotometri, sedangkan pengukuran ekspresi gen SOX2 dilakukan secara kuantitatif dengan metode *real time polymerase chain reaction*. Pada pengukuran ekspresi gen SOX2 dilakukan normalisasi menggunakan *house keeping gene* PUM1 sebagai kontrol dalam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi CD44+/CD24- pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan MEFs menggunakan media CM dan DMEM lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak diko-kultur dengan MEF menggunakan CM dan DMEM. Ekspresi gen SOX2 meningkat pada sel yang diko-kultur dengan MEF di CM dan sel yang diko-kultur dengan MEF dalam DMEM yaitu berturut-turut 83,28 dan 48,33 kali dari kontrol masing masing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi kultur terbaik untuk mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara adalah ko-kultur dengan MEF menggunakan CM sebagai media.

Kata Kunci : *cancer, stem cells, mouse embryonic fibroblast, pluripotency, SOX2, PUM1.*

xiv+83 halaman: 17 gambar; 5 tabel; 13 lampiran

Daftar Pustaka : 57 (1981–2011)

ABSTRACT

Name : Liza Tiara
Program Study : Pharmacy
Title : Co-culture of human breast cancer stem cells with embryonic stem cells to maintain the breast cancer stem cells pluripotency

In objective to understand the role and importance of breast cancer stem cells and the molecular and cellular events that occur during cancer development, it is essential to isolate and propagate breast cancer stem cells in long-term in vitro culture without losing their pluripotency. This study aimed to find the best culture condition with co-cultured system to maintain the breast cancer stem cells pluripotency. The cell cultured on top of a feeder layer formed by mouse embryonic fibroblast (MEF). We observed the expression of breast stem cell markers CD44+/CD24- using spectrofluorometry and analyzed the expression of gene SOX2 using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Fluorescence spectroscopy results showed that CD44+/CD24- expression of cancer stem cells co-cultured in CM and DMEM high glucose with MEF is higher than one cultured in CM or in DMEM high glucose without MEF only. After being normalized by using house keeping gene, PUM1, SOX2 gene expression levels in cells cultured in CM and DMEM with MEF i.e 83,28 and 48,33 times higher, respectively, compared to their control. Result showed that the best condition to maintain pluripotency of breast cancer stem cells was to co-culture the cells with MEF using CM as medium.

Key Words : cancer, stem cells, mouse embryonic fibroblast, pluripotency, SOX2, PUM1.

xiv+83 pages : 17 pictures; 5 tables; 13 appendices

Bibliography : 57 (1981–2011)

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	xii
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 Anatomi Payudara Manusia.....	4
2.2 Identifikasi Sel Punca Kanker Payudara.....	4
2.3 Penanda Permukaan CD24 dan CD44.....	5
2.4 Gen SOX2	6
2.5 <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> dan <i>Conditioned Medium</i>	7
2.6 Analisis Ekspresi CD44+/CD24- dengan Spektrofluorometri.	9
2.7 Isolasi RNA	10
2.8 Normalisasi mRNA	11
2.9 <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>	13
2.10 Analisis Kuantitatif dengan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	16
2.11 Elektrophoresis Gel Akrilamid.....	19
BAB 3. BAHAN DAN CARA KERJA	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
3.2 Perizinan Komisi Etik.....	20
3.3 Bahan	20
3.4 Alat	21
3.5 Cara Kerja.....	21
3.5.1 Persiapan Media Kultur DMEM <i>high glucose</i>	22
3.5.2 Pembuatan MEF <i>Stock Solution</i> dan CM.....	22
3.5.3 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Belum Disortir	23
3.5.4 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Telah Disortir.....	23
3.5.5 Analisis Ekspresi CD44+/CD24- dengan Spektrofluorometri.....	23
3.5.6 Ekstraksi Total RNA	24

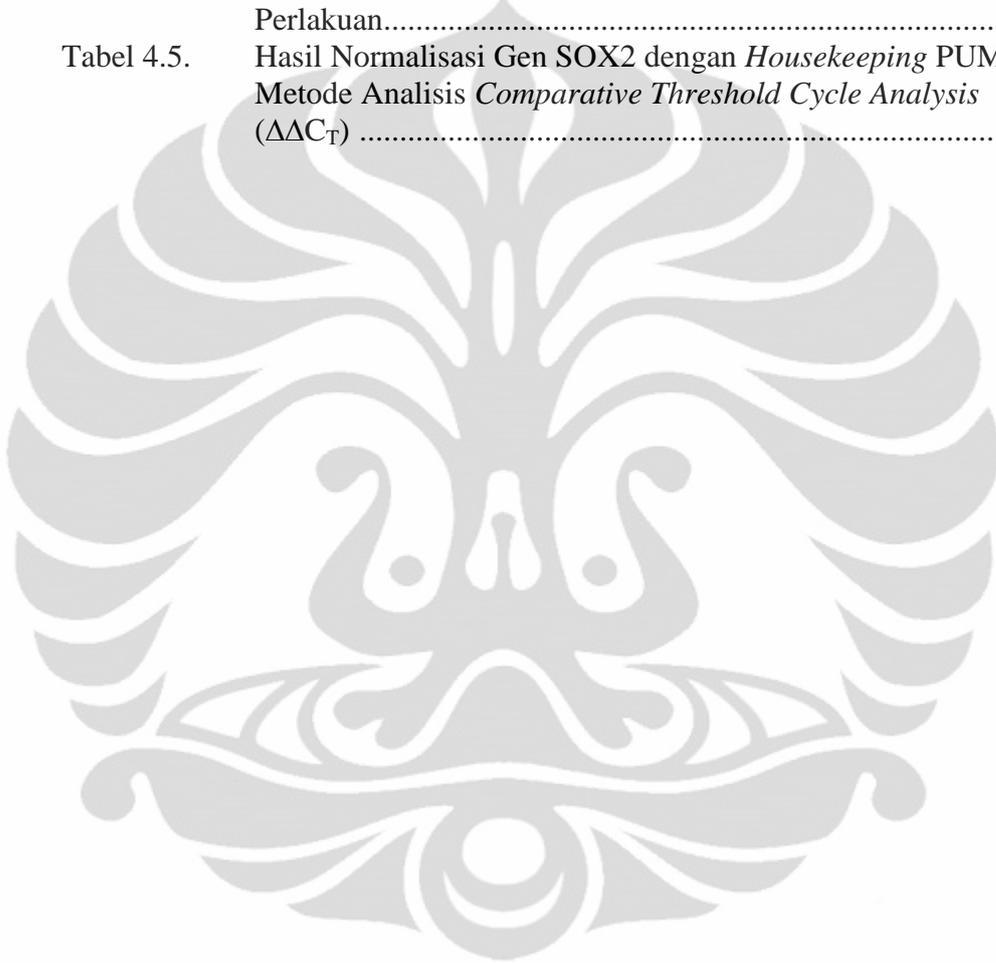
3.5.7 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop.....	24
3.5.8 Optimasi Menggunakan <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>	25
3.5.9 Analisis SOX2 Menggunakan <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>	25
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Belum Disortir	27
4.2 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Telah Disortir	27
4.3 Analisis Ekspresi CD44+/CD24- dengan Spektrofluorometri	29
4.4 Analisis Total RNA dan Analisis Kemurnian Total RNA	31
4.5 Optimasi Menggunakan <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>	33
4.6 Analisis Level SOX2 Menggunakan <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR ACUAN	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
Gambar 2.1.	Anatomi Payudara Normal Manusia.....	4
Gambar 2.2.	Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia	7
Gambar 2.3.	Letak Gen PUM1 pada Kromosom Manusia.....	13
Gambar 2.4.	Proses RT-PCR	15
Gambar 2.5.	Skema Kerja dari <i>SBRY[®] Green I</i>	17
Gambar 2.6.	Plot Amplifikasi pada <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>	17
Gambar 3.1.	Skema Kerja dan Alur Penelitian.....	22
Gambar 4.1.	Pertumbuhan Sel CS09 Kanker yang Belum Disortir.....	27
Gambar 4.2.	Pertumbuhan Sel CS09 Kanker yang Telah Disortir	28
Gambar 4.3.	Kurva Hasil Pengukuran Ekspresi CD44+/CD24-	30
Gambar 4.4.	Hasil Optimasi PCR untuk SOX2	35
Gambar 4.5.	Hasil Optimasi PCR untuk PUM1	35
Gambar 4.6.	Kurva Amplifikasi Gen SOX2.....	38
Gambar 4.7.	Kurva Amplifikasi Gen PUM1	38
Gambar 4.8.	Kurva Perbandingan Level Ekspresi Gen SOX2	38
Gambar 4.9.	Konfirmasi gen SOX2 dengan Elektroforesis.....	40
Gambar 4.10.	Konfirmasi gen PUM1 dengan Elektroforesis.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
Tabel 4.1	Hasil Pengukuran Ekspresi CD24- dan CD44+.....	30
Tabel 4.2.	Hasil Pengukuran Konsentrasi RNA Sel CS09 Kanker Payudara..	32
Tabel 4.3.	Hasil Optimasi SOX2 dan PUM1	34
Tabel 4.4.	Nilai C_T dan ΔC_T dari Hasil <i>Real Time</i> PCR untuk Berbagai Perlakuan.....	36
Tabel 4.5.	Hasil Normalisasi Gen SOX2 dengan <i>Housekeeping</i> PUM1 dengan Metode Analisis <i>Comparative Threshold Cycle Analysis</i> ($\Delta\Delta C_T$)	37



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1.	Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>) 47
Lampiran 2.	Cara Pembuatan Reagen..... 48
Lampiran 3.	Skema proses sortir sel dengan MINIMACs <i>cells separator</i> 50
Lampiran 4.	Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses <i>reverse transcriptase</i> PCR dan <i>real time</i> PCR..... 51
Lampiran 5.	Perhitungan konsentrasi RNA yang digunakan pada <i>real time</i> PCR 52
Lampiran 6.	Hasil pengukuran jumlah sel CD24 ⁺ dan CD44 ⁺ dari kultur sel punca CS09 kanker payudara yang telah disortir..... 53
Lampiran 7.	Posisi dan Urutan Basa Primer SOX2 dan PUM1 54
Lampiran 8.	Kurva <i>Melt Kurve</i> dan <i>Melt Peak</i> Gen SOX2 dan PUM1..... 55
Lampiran 9.	Gambar Alat yang Digunakan dalam Penelitian 56
Lampiran 10.	Surat Persetujuan Komisi Etik..... 57
Lampiran 11.	Spesifikasi Primer SOX2 dan PUM1..... 58
Lampiran 12.	Sertifikat Analisis <i>RNeasy Mini Kit</i> 59
Lampiran 13.	Sertifikat Analisis <i>Qiagen One Step</i> RT-PCR 60

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara memiliki frekuensi kejadian yang tinggi dan merupakan penyebab kematian kedua pada kasus kanker wanita di Indonesia (Depkes RI, 2007, h.52). Menurut WHO sebesar 8–9% wanita mengalami jenis kanker tersebut dan hanya 50% pasien kanker payudara stadium akhir yang mampu bertahan hidup selama 18–30 bulan (Aditama, 2010). Informasi mengenai sel kanker payudara masih sangat sedikit sehingga kebijakan terapi konvensional berdasarkan anggapan bahwa seluruh sel kanker tersebut mempunyai potensi keganasan yang sama dan dapat membentuk sel kanker yang baru. Namun, penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hanya sekumpulan kecil sel kanker yang berperan dalam menginisiasi pembentukan sel kanker baru yang disebut sebagai sel punca kanker. Sel punca kanker atau *Cancer Stem Cells* (CSCs) adalah bagian kecil dari seluruh populasi sel kanker yang memiliki karakteristik *self renewal* yang hampir sama dengan sel punca normal (Bapat, 2008).

Identifikasi sel punca kanker payudara dilakukan pertama kali oleh Al-Hajj et al. (2003) yang menyatakan bahwa sel punca kanker payudara memiliki ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi namun ekspresi penanda permukaan CD24 yang rendah (CD44+/CD24-). Identifikasi dan isolasi sel punca kanker payudara akan sangat menentukan keberhasilan terapi kanker payudara dimasa mendatang yang lebih memfokuskan pada upaya menghilangkan CSCs daripada hanya mengecilkan masa tumor. Oleh karena itu, karakteristik sel punca kanker payudara harus dipelajari, misalnya mekanisme *cells signaling* dan *tumorigenic pathway* yang ditunjukkan oleh sel punca kanker tersebut. Pada umumnya metode *in vitro* digunakan dalam hal mempelajari karakteristik kanker payudara. Sel punca kanker payudara diisolasi dari pasien kemudian dikultur dan dipropagasi untuk keperluan berbagai studi tersebut.

Sel kanker payudara dapat mengalami reprogramming sel sehingga sifat-sifatnya mirip dengan sel punca embrionik normal. Hal tersebut dibuktikan dengan tingginya ekspresi gen *Oct3/4*, *Sox*, *Klf4*, *c-Myc*, *NANOG* dan *Lin 28* pada

sel punca kanker payudara dimana diketahui ekspresi gen tersebut dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel yang telah terdiferensiasi yang disebut *induced Pluripotent Stem Cells* atau iPSCs (Takahashi et al., 2007). Informasi mengenai tingkat ekspresi dan peranan polimorfisme dari gen tersebut penting diteliti untuk menentukan peranannya terhadap pembentukan sel punca payudara.

Sifat sel punca kanker mirip dengan sel punca embrionik normal menyebabkan sel punca tersebut memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai sel yang heterogen dan menghilangkan sifat pluripotensi selama proses kultur dan penyimpanan. Akibatnya, para peneliti gagal mempelajari sifat-sifat sel punca kanker sehingga dilakukan berbagai upaya dalam mempertahankan sifat pluripotensi sel punca kanker payudara yaitu dengan menggunakan *Conditioned Medium* (CM) dari kultur MEF dan *matrix* protein seperti laminin serta faktor pertumbuhan seperti *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Xu et al., 2001; Rosler et al., 2004).

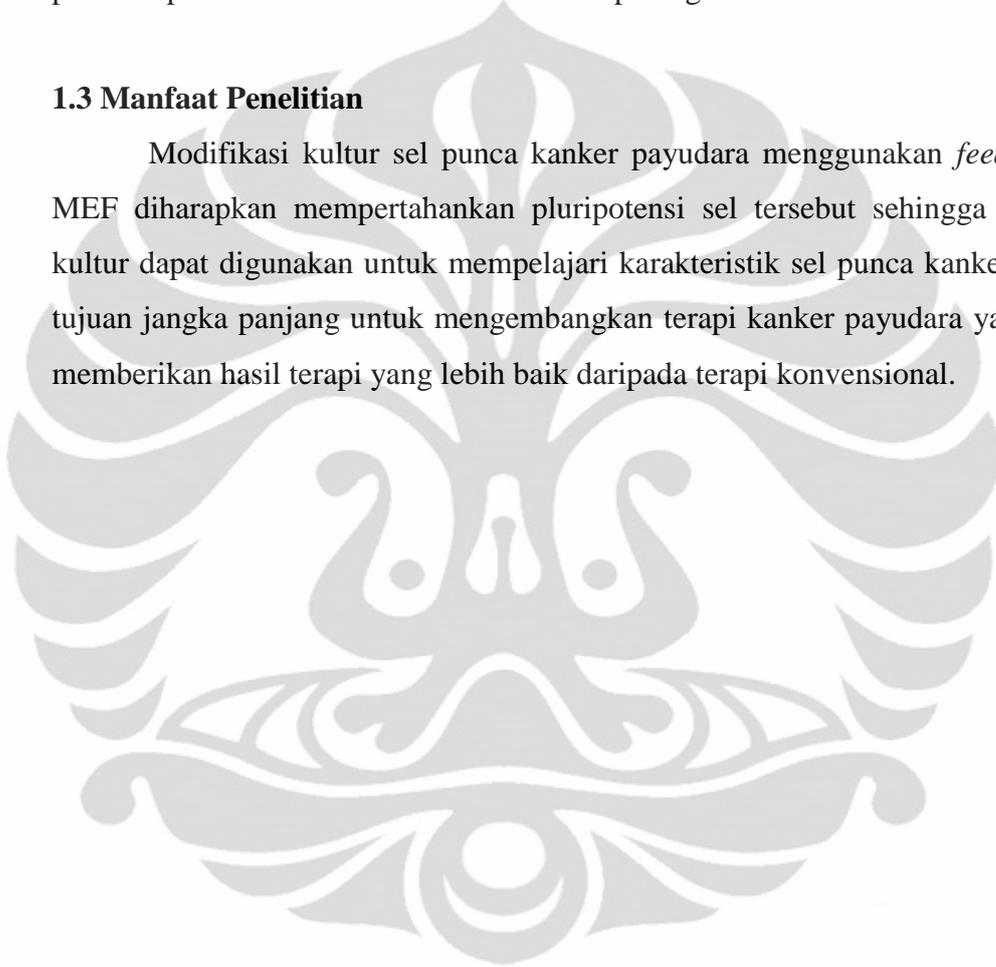
Pada penelitian kali ini akan dilihat peranan *feeder layer Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) dalam mempertahankan sifat pluripotensi sel punca CS09 kanker payudara yang diperoleh dari hasil operasi pengangkatan kanker di Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM) (Kurnia, 2010). *Feeder layer* telah digunakan pada penelitian sebelumnya yang terbukti mampu mempertahankan *human embryonic stem cells* (Thomson et al., 1998). Pengukuran ekspresi level gen SOX2 dan jumlah sel punca yang mengekspresikan penanda permukaan sel CD44+/CD24- digunakan sebagai parameter dalam menilai ketahanan sifat pluripotensi dari sel punca kanker payudara. Jumlah sel punca kanker payudara dihitung dengan metode spektrofotometri. Sedangkan, pengukuran level ekspresi gen SOX2 dilakukan dengan metode *real-time Polymerase Chain Reaction* (*real-time* PCR) secara kuantitatif. Pada pengukuran SOX2 dengan *real-time* PCR dilakukan normalisasi menggunakan *housekeeping gene* PUM1 sebagai kontrol dalam.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh modifikasi ko-kultur sel punca CS09 kanker payudara dengan menggunakan *feeder layer* MEF dan mengetahui kombinasi antara *feeder layer* MEF dan media yang tepat dalam mempertahankan pluripotensi sel tersebut dengan parameter ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- dan ekspresi gen SOX2.

1.3 Manfaat Penelitian

Modifikasi kultur sel punca kanker payudara menggunakan *feeder layer* MEF diharapkan mempertahankan pluripotensi sel tersebut sehingga sel hasil kultur dapat digunakan untuk mempelajari karakteristik sel punca kanker dengan tujuan jangka panjang untuk mengembangkan terapi kanker payudara yang dapat memberikan hasil terapi yang lebih baik daripada terapi konvensional.

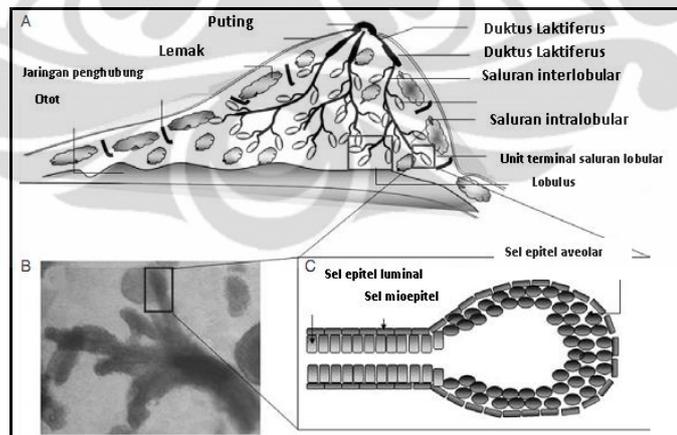


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Payudara Manusia

Kelenjar payudara (*mammary glands*) terdiri dari 15–25 lobus yang dipisahkan oleh jaringan ikat fibrosa dan lemak. Lobus mengandung unit yang lebih kecil yang disebut lobulus yang terdiri dari kelenjar aveoli yang menghasilkan susu pada proses laktasi. Kelenjar alveoli menyalurkan susu melalui saluran di daerah areola membentuk saluran besar yang disebut *lactiferous sinus* kemudian disalurkan ke puting melalui *lactiferous duct*. Jaringan epitel payudara terdiri dari 3 tipe sel yaitu sel mioepitelial yang membentuk lapisan basal aveoli dan duktal, sel epitelial duktal yang membatasi lumen duktal, dan sel epitelial aveolar yang menghasilkan susu. Sel epitelial duktal dan aveolar akan membentuk lapisan luminal (Bapat, 2009). Umumnya kanker payudara menyerang sel epitelial duktal yang disebut *Invasive Ductal Carcinoma* (IDC) yang berkembang dari kanker *Ductal Carcinoma In Situ* (DCI), meskipun kanker payudara dapat berasal dari sel lobular yang disebut *Lobular Invasive Carcinoma* (LIC) yang berkembang dari kanker *Lobular Carcinoma In Situ* (LCI).



[Sumber: Cancer Stem Cells Identification and Target, 2009]

Gambar 2.1. Anatomi Payudara Normal Manusia

2.2 Identifikasi Sel Punca Kanker Payudara

Sel punca kanker merupakan bagian kecil dari populasi sel kanker yang memiliki karakteristik yang mirip dengan sel punca normal. Sel punca kanker

memiliki kemampuan *self renewal* dan berdiferensiasi seperti sel punca normal. Berkembangnya metode identifikasi sel punca kanker berawal pada sistem hematopoetik dengan menggunakan penanda permukaan sel yang dikenal dengan *Cluster of Differentiation (CD)*.

Identifikasi sel kanker payudara dilakukan pertama kali oleh Al-Hajj et al. (2003) yang menyatakan bahwa sel punca kanker payudara memiliki ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi namun ekspresi penanda permukaan CD24 yang rendah (CD44+/CD24-). Suatu penelitian menyebutkan sel punca kanker payudara dapat berkembang dari sel normal maupun sel progenitor yang kehilangan kemampuan regulasi sel. Penelitian pada sel kanker akibat mutasi gen BRCA1 (suatu gen yang berperan sebagai gen regulator pada sel punca payudara normal) membuktikan bahwa sel kanker payudara bersifat heterogen dimana sejumlah sel dari tumor yang sama memiliki karakteristik penanda permukaan sel CD133+CD44+/CD24-, sedangkan sel lainnya hanya menunjukkan ekspresi CD133+ saja (Wright et al., 2008). Populasi sel tersebut resisten terhadap agen kemoterapi, yaitu sisplatin. Sedangkan Li et al. (2008) menemukan bahwa sel punca kanker payudara CD44+/CD24- resisten terhadap lapatinip yang merupakan penghambat reseptor EGFR melalui jalur HER2 sehingga dapat dijadikan prognosis dan respon terhadap kemoterapi (Horiguchi et al., 2010). Penelitian lain yang dilakukan oleh Philips et al. (2006) menemukan bahwa sel punca kanker payudara CD44+/CD24- resisten terhadap radioterapi, bahkan populasi sel tersebut meningkat selama radioterapi.

2.3 Penanda Permukaan Sel CD44 dan CD24

Sel punca kanker payudara memiliki ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi namun ekspresi penanda permukaan CD24 yang rendah (CD44+/CD24-). Molekul CD44 yang merupakan glikoprotein transmembran mengandung banyak residu fosforin dan beberapa ikatan disulfida. CD44 sangat berguna untuk mengubah inti protein dari 37 kDa yang banyak mengandung glikosilasi dari ikatan gula N- dan O- untuk membuat produk protein dengan berat 85–90 kDa. Selain itu dapat berikatan kondroitin sulfat untuk membentuk protein 180–220 kDa dari gel sodium dedosil sulfat (Bolodeoku, J,

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

Sedangkan, molekul CD24 merupakan suatu glikoprotein, *glycophosphatidil-inositol* (GPI) yang diekspresikan pada sel hematopoietik dan sel non-hematopoietik. Glikoprotein ini terdiri dari 27–35 asam amino dengan setengah dari asam aminonya adalah serin dan treonin. Serin dan treonin merupakan tempat yang potensial untuk ikatan O-glikosilasi dan asparaginasi memberikan potensi untuk berikatan N-glikosilasi. CD24 manusia memiliki struktur yang tidak biasa dengan inti hanya memiliki 31 asam amino. Molekul CD24 diekspresikan pada saat regenerasi jaringan. Molekul ini akan diekspresikan secara berlebihan pada keadaan *hematological malignancies* dan pada tumor padat seperti gastrik, renal, nasofaring, hepatoseluler, kolon dan kanker paru-paru (Motari et al., 2009, h.2).

2.4 Gen SOX2

SRY (*Sex Determining Region Y*) *box-2* yang dikenal sebagai SOX adalah suatu faktor transkripsi yang esensial untuk mengatur pluripotensi dari sel punca. SOX adalah gen tanpa intron dari gen yang disebut *overlapping transcript* (SOXOT) yang menghasilkan produk SRY-box2 yang termasuk domain grup mobilitas tinggi HMG-box (*High Mobility Gene*) berisi faktor transkripsi yang bertanggung jawab terhadap sifat pluripotensi dan determinasi sel (Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000; Wegner, 1999). Lokasi sitogenetik dari gen SOX2 adalah 3q26.3-q27 dimana terletak pada kromosom 3 dengan pasangan basa 181,429,721 sampai 181,432,223. Lebih spesifik lagi gen SOX2 terletak lengan kromosom yang lebih panjang pada posisi antara 26.3 dan 27 (Gambar 2.2).



[Sumber: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/Sox2>, 4 Januari 2011]

Gambar 2.2. Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia

Meskipun sel punca kanker payudara diduga terinduksi dari sel yang berbeda, namun populasi sel punca kanker tersebut mengekspresikan gen *stemness* yang sama yaitu *Oct4*, *Noct1*, *ALDH1*, *Fgfr1* dan *Sox* (Ginestier, 2007). Ekspresi gen tersebut diketahui menginduksikan pembentukan sel punca dari sel-sel yang terdiferensiasi (*induced Pluripotent Stem Cells* atau iPCSs) (Takashi et al., 2007). Gen-gen tersebut ditransfeksi ke dalam sel line dengan menggunakan *ecotropic retrovirus* dan terbukti mampu menginduksi pluripotensi sel. Sifat ini mirip dengan sifat onkogen terkait dengan *tumor suppressor* dalam mempengaruhi sel kanker. Penurunan gen supresor meningkatkan pluripotensi sel dan meningkatkan masa hidup dari sel punca embrionik.

Penelitian membuktikan bahwa gen SOX2 terkait dengan kanker pada manusia dimana ekspresi dari gen tersebut cenderung meningkat (Dong et al., 2004). *Sox2* bersama dengan *Oct3/4* terekspresi dengan tinggi pada kanker kelenjar esophagus, kanker payudara, dan glioma (Gure, 2000; Wang et al., 2009; Pinilla et al., 2007; Schimtz et al., 2007). Demikian juga pada penelitian terhadap kanker usus, gen *Sox* bersama dengan *Oct3/4*, *KLF4*, dan *c-Myc* dapat mempengaruhi regulasi NANOG mRNA yang berfungsi sebagai regulator atau agen pemrograman kembali sel (Tsukamoto, 2004; Otsubo, 2008).

2.5 Mouse Embryonic Fibroblast dan Conditioned Medium

Suatu sistem kultur sel kanker secara *in vitro* disebut suatu model kultur karena tidak sama persis dengan sistem biologi sel tersebut berasal. Meskipun demikian, model kultur sel punca kanker payudara mengupayakan propagasi sel tanpa mengubah sifat pluripotensi sel kanker payudara. Sel kanker payudara tidak dapat dikultur dalam jangka waktu yang lama karena dapat terdiferensiasi sehingga berkembang kultur sel embrionik manusia dan tikus dengan menggunakan *feeder layer*. *Feeder layer* efektif digunakan untuk mendukung

pertumbuhan sel yang sulit dikultur. Jenis *feeder layer* yang telah digunakan oleh para peneliti yaitu *mouse embryonic fibroblast* dan *human embryonic fibroblast* (Evans and Kaufman, 1981, Amit et al., 2000; Hovatta et al., 2003; Cheng et al., 2003). Penelitian yang dilakukan oleh Reubinoff et al. (2000) dan Thomson et al. (1998) membuktikan bahwa MEF mampu mempertahankan pluripotensi dan mencegah diferensiasi dari sel hES.

MEF mengontrol diferensiasi dengan cara mensekresikan metabolit yang dibutuhkan oleh sel punca, menyediakan tempat sel untuk melekat dengan sel lain dan mengkondisikan medium. Metabolit yang disekresikan oleh MEF adalah *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Fibroblast Growth Factors 2* (FGFs2), *Transforming Growth Factor β* (TGF β), *Activin*, *Wnts*, *insulin-like growth factor* (IGF), *cytokines* and antagonis BMP. Faktor-faktor tersebut berperan penting dalam mempertahankan pluripotensi sel punca dengan mempengaruhi *stem cells maintenance signaling* termasuk *LIF/Stat3 signaling*, *Wnt/b-catenin signaling*, *BMP signaling*, dan *FGF signaling* (Xu et al., 2005).

MEF mudah untuk ditumbuhkan dan propagasi sel berlangsung cepat. MEF ini harus diinaktifkan agar berhenti berpropagasi dengan cara diirradiasi atau dengan menambahkan mitomisin. *Growth factor* dihasilkan oleh MEF yang diduga berperan penting mencegah diferensiasi sel punca embrionik manusia adalah bFGF2. Selain faktor pertumbuhan tersebut TGF β 1 juga diduga sebagai faktor pertumbuhan yang diduga berperan dalam mempertahankan pluripotensi sel embrionik manusia (Amit et al., 2000; Amit et al., 2004; Beattie et al., 2005; James et al., 2005; Schuldiner et al., 2000; Wang et al., 2005; Xu et al., 2005). Penelitian terakhir membuktikan bahwa kedua faktor pertumbuhan tersebut dapat mempengaruhi *Wnt signalling* yaitu suatu jalur (*pathway*) yang memiliki peranan penting untuk mencegah diferensiasi sel (Sato et al., 2004), meskipun jalur tersebut bukan merupakan jalur tunggal dalam mempertahankan pluripotensi sel (James et al., 2005). Namun, kultur dengan menggunakan *feeder layer* belum mencapai hasil yang maksimal tanpa adanya *conditioned medium* (CM). CM adalah media yang didapatkan pada saat 3 hari pertama kultur primer *feeder cells* MEF (Lim dan Bodnar, 2002).

Namun, penelitian lain menyebutkan bahwa CM tidak dapat mempertahankan pluripotensi sel punca tanpa bantuan substrat dari *feeder layer* atau pengganti *feeder layer* seperti laminin dan matrigel. Selain *growth factor*, sejumlah protein telah diidentifikasi dari MEF dan CM dimana protein tersebut diduga kuat berperan dalam mempertahankan pluripotensi sel embrionik manusia (Xie et al., 2004). Selain menggunakan *feeder layer* berkembang suatu sistem kultur baru yang dikenal dengan *feeder/serum free culture*. *Feeder layer* diganti dengan penambahan *extracellular matrix substrates* termasuk matrigel (membran solubel dari ekstrak sel *Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor*), laminin, atau CM yang mengandung faktor pertumbuhan tertentu yang berperan dalam mempertahankan pluripotensi sel.

Meskipun MEF telah terbukti dapat mempertahankan pluripotensi pada sel punca embrionik manusia, penelitian yang menyebutkan bahwa *feeder layer* dapat mempertahankan kepucaan sel kanker belum ditemukan. Namun berdasarkan teori yang menyatakan kesamaan karakteristik sel punca kanker dengan sel embrionik normal atau iPSCs, maka terdapat kemungkinan model kultur *in vitro* tersebut efektif digunakan untuk propagasi sel kanker payudara (Lim dan Bodnar, 2002).

2.6 Analisis Ekspresi CD44+/CD24- dengan Spektrofluorometri.

Pada tahun 1944, Albert Coons menunjukkan bahwa antibodi dapat diberi label dengan suatu molekul yang berfluoresensi. Molekul fluorofor dapat menyerap satu panjang gelombang dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang lain. Jika molekul antibodi diberi label dengan pewarna fluoresensi atau fluorokrom maka akan dapat dideteksi oleh emisi cahaya berwarna ketika tereksitasi oleh cahaya pada panjang gelombang yang sesuai (Goldsby, 1992, h.593). Fluoresensi adalah peristiwa dimana energi yang diserap suatu benda dikembalikan kedalam bentuk energi yang lain. Tabrakan dengan molekul menyebabkan kehilangan energi tersebut dalam bentuk panas. Kehilangan ini mungkin hanya sebagian, ke tingkat vibrasi terendah pada excited state, dan sisanya dilepaskan dalam bentuk radiasi dengan energi yang lebih kecil atau panjang gelombang yang lebih tinggi. Radiasi ini yang disebut fluoresensi (Handojo, 2003, h.45).

Ada tiga tahapan mekanisme agar fluoresensi dapat terjadi, yaitu (Handoyo, 2003, h.47) yaitu *excitation*, *excited-state life time*, dan *fluorescence emission*. Pada tahap *excitation* suatu foton energi cahaya ($h\nu_{EX}$) yang diberikan dari sumber cahaya lampu atau laser kemudian energi tersebut diserap oleh fluorofor, sehingga terjadi eksitasi elektron didalamnya. Tahap *excited-state life time* terjadi selama waktu yang terbatas (biasanya 1–10 nanodetik). Selama masa ini fluorofor mengalami perubahan konformasi dan mengalami interaksi dengan lingkungan sekitarnya. Reaksi ini memiliki dua hal yang penting. Pertama energi yang dipancarkan sebagian akan dihamburkan, sehingga terjadi penurunan energi eksitasi dari fluorofor pada keadaan mula-mula. Kedua tidak semua molekul akan tereksitasi oleh penyerapan energi. Tahap *fluorescence emission* dimana energi foton yang dipancarkan, mengembalikan fluorofor kedalam keadaan awalnya. Seharusnya energi akan hilang selama *excited-lifetime*, melainkan energi akan melemah maka akan terjadi peningkatan panjang gelombang. Perbedaan energi tersebut disebut dengan pergeseran stokes. Kemudian perbedaan energi tersebut akan terdeteksi oleh alat.

Komponen dari spektrofourometer adalah sumber cahaya (*light sources*), filter cahaya (*excitation monocromator and emission monocromator*), dan detektor. Sumber cahaya yang digunakan pada spektrofluoresensi adalah yang dapat menghasilkan spektrum yang memiliki energi kontinu yaitu lampu tungsten-halogen, lampu merkuri, dan lampu xenon. Filter cahaya berguna untuk menyeleksi panjang gelombang cahaya yang diemisi atau dieksitasi oleh sel sampel. Detektor yang digunakan adalah detektor *photomultiplier* yang dapat menjangkau seluruh rentang panjang gelombang *UV-visible*. Pada beberapa pengukuran kemungkinan mendapatkan nilai *blank* yang tinggi dapat terjadi. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh bahan kuvet dan kebersihan kuvet, jenis pelarut sampel dan kontaminasi dari reagen lain yang digunakan dalam penelitian.

2.7 Isolasi RNA

RNA merupakan polimer yang terdiri dari rangkaian ribonukleosida monofosfat yang dihubungkan dengan ikatan fosfodiester. RNA yang dimiliki oleh sel eukariotik dan prokariotik berbentuk makromolekul untai tunggal. RNA

berkaitan erat dengan ekspresi gen. Berbeda dengan jumlah DNA yang relatif stabil, jumlah dari mRNA dapat berubah sesuai kondisi lingkungan. 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. *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 (Alberts et al., 1994).

RNA relatif tidak stabil dan mudah rusak terutama oleh RNAase. RNAase adalah suatu molekul yang sangat stabil, tidak membutuhkan kofaktor, sangat efektif pada konsentrasi rendah dan banyak terdapat pada debu dan kulit manusia. Pada ekstraksi RNA dilakukan deproteinisasi untuk memisahkan RNA dari protein sehingga RNA dapat diendapkan dengan etanol. Guanadinium tiosianat umumnya digunakan dalam ekstraksi RNA adalah yaitu suatu *chaotropic agent* yang dapat mendenaturasi protein dan inhibitor RNAse yang baik (Walker dan Rapley, 2000).

Konsentrasi RNA dapat dihitung dengan menggunakan spektrofotometri UV yang dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dimana 1 unit absorbansi setara dengan 40 ug/ml RNA. Kemurnian RNA dapat dilihat dari nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dsan 280 nm atau yang disebut dengan A260/A280. Nilai perbandingan harus ~2.1 yang menandakan bahwa RNA tersebut telah murni. RNA diukur dalam larutan buffer untuk menjaga kondisi pH. Pada pH yang lebih rendah akan menyebabkan nilai A260/A280 menjadi lebih rendah dan mengurangi sensitifitas. (Wilfinger, Mackay, dan Chomczynski, 2000).

2.8 Normalisasi mRNA

Pada saat proses analisis RNA dapat terjadi variasi yang terjadi dalam ekstraksi RNA sehingga mempengaruhi jumlah mRNA yang akan diampifikasi. Variasi pada jumlah mRNA ini akhirnya akan mempengaruhi analisis level RNA karena mRNA adalah cetakan yang digunakan untuk mensintesis cDNA oleh

enzim *reverse transcriptase* yang selanjutnya akan diubah menjadi *double strand* DNA oleh *Taq polymerase*. Oleh karena itu, dilakukan langkah-langkah untuk meminimalisir variasi yang mungkin yang terjadi yang disebut normalisasi.

Beberapa langkah normalisasi yang pernah dilakukan adalah menyeragamkan jumlah sel yang akan diekstraksi walaupun tidak menjamin dapat meminimalisasi variasi yang mungkin terjadi (Huggett, 2005). Langkah selanjutnya adalah penyeragaman jumlah total RNA yang akan digunakan dalam proses RT-PCR agar pengukuran level RNA yang dilakukan lebih akurat (Bustin, 2000). Pada proses ekstraksi RNA, kontrol terhadap kualitas RNA juga perlu dilakukan untuk menjamin kemurnian total RNA (Bustin dan Nolan, 2004). Langkah selanjutnya adalah standarisasi mRNA dengan menggunakan *housekeeping genes* sebagai indikator (Radonic, 2004).

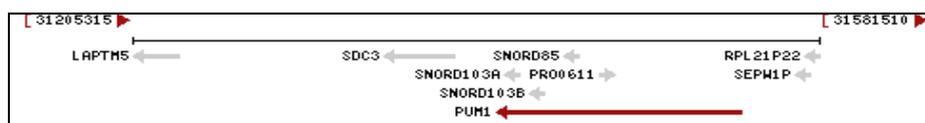
Ekspresi *housekeeping genes* ini telah dipelajari baik dalam sel normal maupun sel kanker dimana penggunaannya terbukti efektif dalam mengontrol variasi yang terjadi pada analisis RNA (Gale, 2005). Suatu gen disebut *housekeeping genes* karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan 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 yaitu *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), sintesis purin (*hypoxanthin ribosyltransferase*), *protein folding* (*cyclophilin*), atau sintesis subunit ribosom (rRNA) (Vandesompele, 2002).

Housekeeping genes yang ideal adalah gen yang ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada kondisi percobaan yang berbeda. 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, 2000) melaporkan bahwa GADPH pada kanker payudara diregulasi oleh estradiol dan menunjukkan ekspresinya bergantung pada dosis estradiol yang diberikan sehingga penggunaan GADPH sebagai *housekeeping genes* pada kanker payudara tidak tepat.

Pada penelitian ini, *housekeeping genes* PUM1 (Pumilio homolog *Drosophila* varian 1) digunakan berdasarkan pada dua penelitian sebelumnya. Pada penelitian yang pertama (Lyng, 2008) menggunakan 8 *housekeeping genes* yang diuji pada 33 sampel sel kanker payudara dan hasilnya dianalisis dengan menggunakan statistik deskriptif yaitu geNorm dan NormFinder. Penelitian yang kedua (McNeill, Miller, dan Kerin, 2007) menggunakan 12 *housekeeping genes* yang diuji terhadap 27 sampel sel kanker payudara dan dianalisis dengan dua model statistik yang berbeda.

Hasil dari keduanya menunjukkan bahwa ekspresi PUM1 paling stabil dan dapat digunakan sebagai internal kontrol (*housekeeping genes*). PUM1 merupakan gen yang terletak dalam kromosom manusia 8q24.21 (Gambar 2.3) dan diduga berperan penting dalam embriogenesis, pertumbuhan dan diferensiasi sel. Gen tersebut mengkode keluarga protein PUF yang memiliki peran penting dalam proses pengikatan RNA. Protein tersebut terkait 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 ditranslasi. (National Center of Biotechnology Information, 2010).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 12 Mei 2011]

Gambar 2.3. Letak Gen PUM1 pada Kromosom Manusia.

2.9 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (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. Teknik tersebut yang paling sering digunakan dalam molekular biologi karena cepat dan relatif murah (Erlich, 1989). Secara garis besar PCR terdiri dari tiga langkah (Application Manual, 1995) yaitu: (i) denaturasi, yaitu pemanasan awal pada suhu 95°C untuk mendenaturasi kompleks DNA secara komplit. (ii) Penempelan primer (*primer annealing*) pada temperature 55–72°C, (iii) Polimerisasi untai baru DNA oleh Taq polymerase, yaitu secara normal dilakukan pada temperatur 72°C (merupakan temperatur optimal *Taq polymerase*). Jumlah siklus yang diperlukan oleh sebagian besar PCR adalah 25–40 siklus.

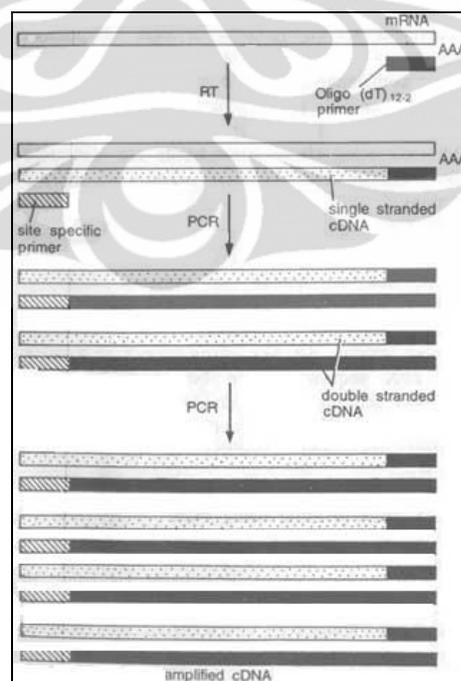
Komponen-komponen yang diperlukan dalam proses PCR adalah (i) DNA cetakan (template DNA); (ii) dua primer oligonukleotida; (iii) enzim; (iv) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari empat macam nukleotida, yaitu dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP; (v) kation Mg²⁺ yang diperlukan oleh *Taq Polymerase* untuk penambahan nukleotida; (vi) larutan penyangga yang umumnya mengandung 10 mM Tris pH 8,4, dan 50 mM KCl (Erlich, 1989).

DNA polymerase digunakan untuk membentuk DNA baru dari DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang mengandung daerah sekuens tertentu yang akan diamplifikasi, yaitu segmen DNA berutas tunggal (15–25 basa nukleotida) yang menentukan bagian awal dan akhir dari daerah yang akan diamplifikasi yang stabil terhadap pemanasan. Umumnya digunakan *Taq Polymerase* yang didapat dari *Thermus aquaticus*. Enzim ini menyalin bagian yang akan diamplifikasi.

Primer yang umum digunakan adalah primer oligo (dT) yang mempunyai rangkaian pendek basa timin merupakan primer yang selektif untuk rangkaian poly A⁺ yang hanya dimiliki mRNA. Primer oligo (dT) untuk cetakan total RNA dapat mencegah enzim *transcriptase* untuk mentranskripsi cDNA dari cetakan non-mRNA. Beberapa syarat primer yang ideal yaitu (i) mempunyai panjang 18–28 pasangan basa; (ii) Suhu leleh (T_m) berada pada rentang 52–65°C; (iii) tidak mempunyai *specific binding site* pada ujung 3' sehingga tidak terjadi mispriming; (iv) tidak mempunyai *secondary priming site*; (v) tidak membentuk formasi hairpin yang signifikan (>3bp); (vi) sebaiknya komposisi basa G+C berkisar 50–60% (Application Manual, 1995).

Pada *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) molekul RNA dikonversi menjadi sekuens *complementary DNA* (cDNA) yang merupakan molekul yang lebih stabil dibandingkan RNA (Fairell, 2005). cDNA adalah molekul berutas tunggal yang disintesis dengan RNA sebagai cetakan dengan menggunakan reverse transcriptase (RT), kemudian cDNA yang terbentuk diamplifikasi dengan prinsip yang sama dengan PCR standar.

RT-PCR terdiri dari dua proses, yaitu (i) sintesis cDNA dari RNA dengan menggunakan *reverse transcriptase* (MMLV, AMV, *Modified RNase H- Enzyme* atau Mn²⁺ dependent) dan (ii) amplifikasi cDNA. Sintesis cDNA terjadi melalui dua langkah, yaitu (i) mRNA diinkubasi dengan *reverse transcriptase*, suatu enzim yang diperlukan oleh mRNA untuk sintesis cDNA ; (ii) mRNA yang masih berikatan cDNA yang dihasilkan harus dihilangkan dengan cara dihidrolisis dengan alkali atau enzim sehingga didapat cDNA berutas tunggal (Gilbert, 2006). Pada proses ini terdiri RNA ditambahkan primer yang sesuai kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 70°C selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA, diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit untuk proses penempelan primer dan terakhir dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit untuk menginaktifkan *reverse transcriptase*.



[Sumber : Fairell, 2005]

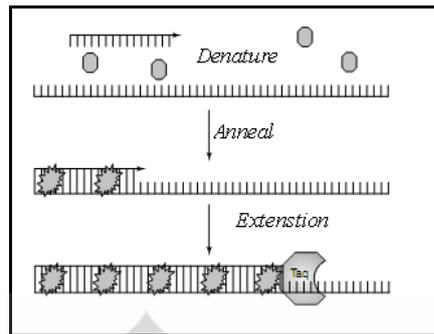
Gambar 2.4. Proses RT-PCR

Enzim *reverse transcriptase* disebut “*RNA-dependent DNA polymerase*”. 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* (Mn²⁺-dependen). Penggunaan masing-masing enzim tersebut mempunyai beberapa keuntungan dan kerugian tersendiri. Pada amplikasi cDNA 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 (Gambar 2.4). Penggunaan *one step* RT-PCR yang dilakukan dengan satu langkah (*one step*) dimana proses *reverse transcription* dan proses PCR dilakukan dalam satu proses (*one tube*) 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 dan Nolan, 2004).

2.10 Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Penelitian ini RT-PCR digunakan untuk mencari suhu optimal dari gen SOX2 dan PUM1, namun analisis secara kuantitatif digunakan *real time* RT-PCR. Prinsip kerja *real time* RT-PCR tidak jauh berbeda dengan RT-PCR konvensional seperti yang dijelaskan sebelumnya. Perbedaan dasar antara keduanya yaitu: (i) Analisis ampikon menggunakan reporter fluoresen dan tidak dengan menggunakan gel elektroforesis konvensional dan (ii) Ampikon dapat dianalisis dari setiap siklus, berbeda dengan PCR konvensional yang hanya mendeteksi pada saat end-point.

Penelitian ini menggunakan fluorokrom *SBRY[®] Green I* yang mengikat pada alur minor dari DNA beruntai ganda yang tereksitasi pada 498 nm dan teremisasi pada 522 nm. *SBRY[®] Green I* digunakan secara luas karena lebih murah dibandingkan dengan menggunakan *probe* fluoresen, mudah untuk digunakan dan tidak mengganggu kerja dari *DNA polymerase*. Namun, kelemahan dari *SBRY[®] Green I* merupakan bukan *sequence specific dye* sehingga dapat berikatan dengan untaian DNA ganda manapun (Gambar 2.5).

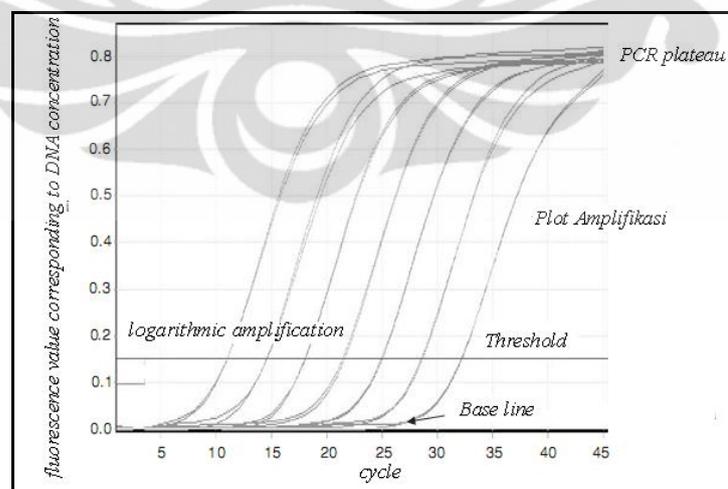


[Sumber: Michael, 2006]

Gambar 2.5. Skema Kerja dari *SBR[®] Green I*

Selama denaturasi dimana yang ada merupakan *single strand DNA* maka *SBR[®] Green I* berada dalam keadaan yang tidak terikat (○) sehingga tidak memberikan signal fluoresen. Sedangkan selama fase *annealing* dan fase ekstensi *SBR[®] Green I* berikatan dengan ampikon yang berupa *double strand DNA* sehingga memberikan peningkatan sinyal fluoresens yang signifikan.

Peningkatan sinyal yang dideteksi oleh reporter menunjukkan peningkatan jumlah produk. Karena intensitas dari fluoresens dapat dideteksi dan diukur pada setiap siklus maka dapat diketahui pada siklus berapa terdapat peningkatan sinyal fluoresens secara signifikan. Hubungan antara jumlah siklus dan peningkatan sinyal fluoresens terlihat dalam suatu plot ampikon seperti pada Gambar 2.6.



[Sumber: Cambridge University Press, 2010]

Gambar 2.6. Suatu Plot Amplifikasi pada *Real-Time PCR*

Base line menunjukkan siklus dimana sinyal yang dideteksi tidak signifikan. Nilai *threshold cycle* (C_T) menunjukkan pada siklus mana sinyal melewati batas *Threshold* dimana jumlah ampikon bertambah, semakin banyak yang berikatan dengan *SBRY[®] Green I* dan memberikan signal fluoresen yang signifikan. Nilai C_T tersebut dapat menunjukkan tingkat ekspresi gen target. Nilai C_T *lower* menunjukkan amplifikasi dari jumlah template paling banyak sedangkan nilai C_T *higher* amplifikasi dari jumlah template paling sedikit.

Umumnya terdapat berbagai pendekatan untuk menghitung jumlah *template* yang didapat dari *real-time* PCR (*Biorad Real-Time Applications Guide*) yaitu metode kuantifikasi absolut dan metode kuantifikasi relatif. Pada metode kuantifikasi absolut kurva standar terlebih dahulu dibuat dengan menggunakan RNA yang telah diketahui konsentrasinya. Kemudian kurva ini dijadikan kurva standar untuk mengekstrapolasi informasi kuantitatif dari RNA target. Sedangkan pada metode kuantifikasi relatif salah satu dari sampel ditentukan sebagai kalibrator dan target dibandingkan dengan kalibrator untuk menunjukan level ekspresi relatif. Metode yang termasuk dalam metode kuantifikasi relatif adalah metode livak atau perbandingan *delta delta threshold* ($\Delta\Delta C_T$ atau DDC_T), metode ΔC_T yang merupakan variasi dari metode livak, dan metode *pfaffl*.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode perbandingan $\Delta\Delta C_T$. Metode ini digunakan karena nilai standar tidak diketahui sehingga target dibandingkan dengan nilai referensi yang dipilih (misalnya level ekspresi *housekeeping* yang sesuai). Agar nilai C_T valid, efisiensi pada saat amplifikasi dari gen target harus sama dengan saat amplifikasi gen referensi dalam penelitian ini efisiensi sama dengan 100%. Nilai yang diperoleh merupakan nilai perbandingan relatif terhadap kontrol (Livak & Schmittgen, 2001).

$$\Delta C_{T \text{ eksperimen}} = C_{T \text{ target pada eksperimen}} - C_{T \text{ housekeeping pada eksperimen}} \quad (3.1)$$

$$\Delta C_{T \text{ kontrol}} = C_{T \text{ target pada kontrol}} - C_{T \text{ housekeeping pada kontrol}} \quad (3.2)$$

$$\Delta\Delta C_T (DDC_T) = \Delta C_{T \text{ kontrol}} - \Delta C_{T \text{ eksperimen}} \quad (3.3)$$

Kemudian perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan persamaan : Perbandingan level ekspresi gen = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (3.4)

2.11 Elektroforesis gel akrilamid

Teknik elektroforesis digunakan untuk memastikan gen yang dianalisis melalui proses PCR adalah gen yang diinginkan dengan membandingkan letak pita yang dihasilkan dengan penanda gen (*marker atau gen ruler*) jenis tertentu. 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 dalam bentuk murni akrilamid berwujud padatan kristal putih dan tidak berbau. Pada suhu ruang, akrilamid larut dalam air, etanol, eter, dan kloroform. Akrilamid dapat membentuk rantai polimer panjang yang dikenal dengan poliakrilamid. Gel akrilamid digunakan sebagai fase diam dalam gel elektroforesis dengan konsentrasi 8%. 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 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 LOKASI PENELITIAN

Penelitian dilakukan dari Februari 2011 sampai Mei 2011 di Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), Gedung IASTH lantai 8, Jalan Salemba 4, Jakarta Pusat 10430.

3.2 PERIJINAN DARI KOMISI ETIK

Persetujuan etis diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2009 untuk payung penelitian yang berjudul “Analisis Pluripotensi dan Ekspresi *Mangane Superoxide Dismutase* (MnSOD) pada sel punca kanker payudara” sebagaimana terlampir pada Lampiran 10.

3.3 BAHAN

Sampel adalah suspensi sel CS09 kanker payudara yang dikoleksi oleh tim peneliti pada payung penelitian tersebut diatas. Suspensi sel tersebut diperoleh dari pengangkatan tumor pasien penderita kanker payudara dari Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM) pada bulan Agustus 2009 sampai April 2010 (IHVCB). *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) (IHVCB), *Conditioned Medium* (CM) (IHVCB), DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*), 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], natrium bikarbonat 7,5% [Invitrogen, USA], PBS (*Phospate Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA [Sigma, USA], trypan blue [Sigma, USA], *Collagenase IV* 10 mg/ml (Gibco, USA) BSA (*Bovine Serum Albumine*) [Sigma Aldrich, USA], *RNeasy Mini Kit* [Qiagen, Jerman], β -mercaptoetanol, *Bio-rad iScriptTM One Step RT-PCR Kit with SYBR[®] Green, 2000* [Bio-rad, USA], *OneStep RT-PCR* [Qiagen, Jerman], MgCl [Qiagen, Jerman], *RNAse inhibitor* [Invitrogen, USA], primer SOX2 [Eurogentec, Singapore], primer PUM1 [1stBase, Indonesia], akrilamid, bisakrilamid dan trisbase [Promega, USA], *ammonium persulfate* [Promega, USA], TEMED (N,N,N',N' Tetrametiletilenediamin) [Biorad, USA], 6x *loading*

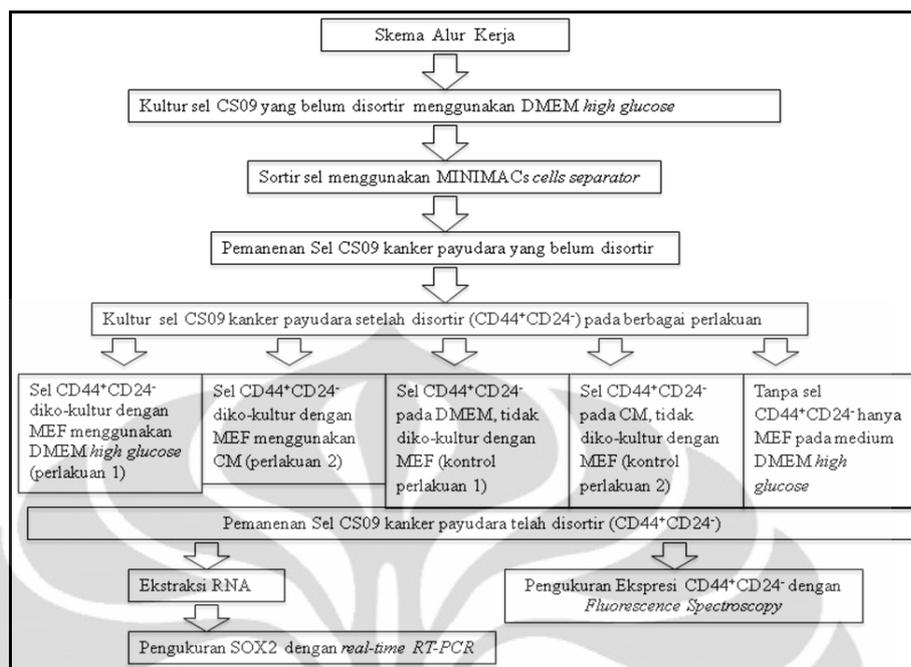
dye [Vivantis, Malaysia], etidium bromida [Promega, USA], Penanda *GeneRuler*TM 100bp DNA Ladder [New England Biolabs, UK] (Lampiran 2).

3.4 ALAT

Alat yang digunakan adalah Biorad *Minioption RT-PCR* [Biorad, USA], *PCR Thermal Cycler PTC-200TM Programmable Thermal Controller* [MJ Research, USA], *Biosafety Cabinet* (BSC) [Esco, China], CO2 Inkubator IL-60160-1491 [Barnstead, USA], Mikroskop Olympus CKX-41 SF dengan Lensa WHB-10X/20 [Olympus, Japan], sentrifus [TOMY Digital Biology, Jepang], mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], Pipet *Serologic* [Betcon], Pipet mikro, Pipet Tips Steril 1000 µl; 200 µl [Axygen], tabung konikal 50 ml; 15 ml dan 10 ml [Falcon, USA], *flask* [Sigma Aldrich, USA], *Haemocytometer Chamber* [Sigma Aldrich, USA], *vortex mixer*, Spektrofotometer NanoDrop ND2000 [Thermo Scientific, USA], *freezer* [Vestfrost, Denmark], *deep freezer* -80⁰C [New Brunswick Scientific, UK], timbangan analitik [Adventurer], lemari berpendingin [Sanyo, Jepang], alat elektroforesis [Biorad, USA], tabung mikrosentrifus 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml [Axygen, USA], kamera digital [Sony, Jepang], UV *transilluminator* [Biorad, USA], autoklaf [Hirayama, Jepang], *ice maker* [Hirayama, Jepang] (Lampiran 9).

3.5 CARA KERJA

Pada penelitian ini suspensi sel CS09 kanker payudara yang belum disortir dikultur pada media DMEM *high glucose* kemudian setelah konfluen dilakukan pemanenan sel dan disortir dengan menggunakan MINIMACs *cells separator* yang dilakukan oleh tim IHVCB-UI. Sel yang didapatkan adalah sel punca kanker payudara dengan penanda permukaan CD44+/CD24-. Kemudian sel dikultur dengan perlakuan kultur yang berbeda dan dilakukan pemanenan setelah sel konfluen. Sebanyak $7,5 \times 10^4$ sel digunakan untuk pengukuran level ekspresi gen SOX2 menggunakan *real time* PCR dengan terlebih dahulu mengekstraksi RNA, sedangkan 50.000 sel digunakan untuk pengukuran ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- menggunakan spektrofotometer (Gambar 3.1.)



Gambar 3.1 Skema kerja dan alur penelitian

3.5.1 Persiapan media kultur DMEM *high glucose*

DMEM sebanyak 43 ml ditambahkan 5 ml FBS 10%, 500 μ l *penstrep*, buffer *Sodium-Hepes* 1M 1 ml dan 500 μ l natrium bikarbonat lalu kocok homogen secara lembut untuk mencegah timbulnya buih dan dikerjakan pada suhu 25°C.

3.5.2 Pembuatan MEF *stock solution* dan CM

MEF yang akan digunakan tersedia dalam bentuk *stock solution* yang melalui beberapa tahapan yang dikerjakan oleh IHVCB. Tikus dibedah, uterus diambil, diletakkan pada cawan petri, dibilas dengan PBS. Kemudian embrio dipisahkan dari plasenta, bagian kepala dibuang dipotong-potong dan ditambahkan tripsin-EDTA diinkubasi selama 10 menit. Tripsin dinetralkan dengan medium kultur (DMEM 90 % dan FBS 10%, *penstrep*). Kemudian dikultur selama tiga hari dalam *flask* (3 embrio : 1 *flask*). Medium disimpan dan disebut sebagai *conditioned medium* (CM). Selanjutnya dilakukan pemanenan dengan menambahkan tripsin-EDTA dan diinkubasi selama 6 menit. Kemudian ditambahkan medium kultur untuk menetralkan tripsin dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan dibuang dan diresuspensi dengan medium kultur (penyimpanan MEF di nitrogen cair dengan menambahkan *cryomedium* (FBS : DMEM : DMSO (5:4:1)) (IHVCB, n.d. a).

3.5.3 Kultur sel CS09 kanker payudara yang belum disortir.

Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung konikal 15 ml, ditambahkan DMEM *high glucose* sampai 12 ml dan dihomogenkan dengan pemipetan. Kemudian dipindahkan ke dalam *flask* T-75 dan diinkubasi dalam inkubator yang dialiri 5% CO₂ dan dilengkapi lampu UV. Medium kultur sel diganti setiap 3-4 hari sekali atau sampai terlihat medium menguning kecoklatan. Pergantian medium dilakukan dengan membuang larutan medium yang berada dalam *flask* dengan menggunakan pipet serologi dan sebanyak 12 ml medium baru dimasukkan ke dalam *flask* tersebut. Proses pemanenan dilakukan dengan tripsin-EDTA. Sel disuspensi dalam medium kemudian di sortir dengan MINIMACs *cells separator* (IHVCB, n.d. a). Proses penyortiran dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.5.4 Kultur sel CS09 kanker payudara yang telah disortir.

Sebanyak 20.000 sel CD44+/CD24- diresuspensikan ke dalam 1 ml medium kultur dan dikultur pada *plate* dengan perlakuan berbeda tiap *well*. Sebelum sel di ko-kultur, *feeder layer* MEF harus disiapkan terlebih dahulu dengan mengkultur suspensi sel MEF pada *well* sampai 80–90% *confluent*. Setelah dicapai pertumbuhan maksimal kemudian dilakukan pemanenan dengan ditambahkan *collagen IV* 10 mg/ml sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 1 ml medium kultur dan sel CD44+/CD24-dipipet. MEF *feeder layer* akan tertinggal pada *plate*.

3.5.5 Analisis ekspresi CD44+/CD24- dengan spektrofлуorometri

Sel yang diperlukan 50.000 sel dari masing masing perlakuan tersebut. Sejumlah sel tersebut dibagi menjadi 2 tabung dengan jumlah 25.000 sel masing-masing tabung. Tabung kontrol berisi sel dari salah satu perlakuan. Kemudian dicuci dengan larutan 1% BSA /PBS (*Phosphate Buffered Saline/Bovine Serum Albumine*) 500 µl sebanyak 2 kali. Selanjutnya diinkubasi dengan larutan 1% PBS/BSA 500 µl selama 20 menit. Kemudian ditambahkan *mouse antibody* anti-CD24⁺ dan *rabbit antibody* anti-CD44⁺ yang terkonjugasi dengan *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) dan *rhodamine isothiocyanate*. Pada tabung kontrol tidak ditambahkan antibodi. Kemudian diinkubasi selama 1 jam. Kemudian dicuci

dengan menggunakan larutan 1% PBS/BSA 500 µl sebanyak 2 kali. Selanjutnya diresuspensikan ke dalam larutan PBS 3 ml. Pengukuran sel CD24⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan pengukuran sel CD44⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm.

3.5.6 Ekstraksi Total RNA

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan *RNeasy Mini Kit*. Sertifikat analisis dapat dilihat pada Lampiran 12. Prosedur yang digunakan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh produsen. Setelah ditambahkan buffer RLT, suspensi sel dihomogenkan lalu dilewatkan pada spin kolom *Qiashredder* dan disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 350 µl etanol 70 % dan dihomogenkan. Kemudian 700 µl larutan yang terdapat dalam *tube* dilewatkan pada kolom spin *RNeasy* disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang kemudian dicuci dengan 700 µl buffer RW1 yang mengandung guanidin tiosianat dan etanol dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Selanjutnya membran spin kolom dicuci dengan 500 µl buffer RPE dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Langkah tersebut diulangi. *Tube* diganti dengan yang baru, disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan membran dari etanol karena adanya etanol dapat menghambat reaksi RT-PCR. Kemudian buang *tube* bersama dengan supernatan. RNA yang berada di membran spin kolom dilarutkan dengan 20 µl air bebas nuklease dan sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Langkah tersebut diulangi. Larutan yang berada dalam *tube* mengandung RNA yang kemudian dialiqout ke dalam tube PCR masing-masing 10 µl dan disimpan dalam *deep freezer* -80 °C untuk menjaga kualitas RNA (RNeasy Mini Handbook, 2006)

3.5.7 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

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 inisialisasi dengan menempatkan 1 µl air bebas nuklease pada permukaan optik

bagian bawah, diturunkan lengan dan diklik ‘‘Initialize’’ pada *software* NanoDrop. Selanjutnya, dilakukan blank measurement dengan menempatkan 1 μ l air bebas nuklease, ditutup lengan dan diklik ‘‘Blank’’ pada *software* NanoDrop.. Setelah selesai, ditempatkan kembali 1 μ l sampel RNA pada permukaan optik bagian bawah, ditutup lengan dan diklik ‘‘Measure’’. Pada pengukuran sampel RNA, perhatikan nilai 260/280. Nilai ini harus menunjukkan 1,8-2,1 untuk menentukan bahwa RNA telah murni (Ausubel, 2001, NanoDrop 2000 Spectrophotometer User’s Manual., 2008)

3.5.8 Optimasi menggunakan *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

Penyiapan RT-PCR ini menggunakan *Qiagen OneStep RT-PCR* [Qiagen]. Komposisi dapat dilihat lebih jelas pada Lampiran 4. Ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 ml ditambahkan masing masing 2 μ l 5x *Qiagen OneStep RT-PCR* buffer, 2 μ l *Q-solution*, 0,4 μ l *dNTP mix* 10 mM, 0,6 μ l *Primer Forward* 10 mM, 0,6 μ l *Primer Reverse* 10 mM, 0,1 μ l *RNase inhibitor*, 0,4 μ l *Enzyme Mix*, 0,25 μ l MgCl, 1,65 μ l air bebas nuklease dan 2 μ l RNA cetakan yang sudah disamakan konsentrasinya. Untuk kontrol negatif hanya terdiri dari air bebas nuklease yang ditambahkan 3,65 μ l sehingga volume akhirnya 10,0 μ l. Penyiapan RT-PCR ini harus dilakukan dalam es untuk menjaga agar enzim tidak bekerja sebelum dimasukkan kedalam mesin PCR. Sertifikat analisis dari *Qiagen OneStep RT-PCR* dapat dilihat pada Lampiran 13.

3.5.9 Analisis SOX2 menggunakan *real time polymerase chain reaction*

Ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 ml ditambahkan 2x *SYBR[®] Green RT-PCR Reaction Mix*, *Primer Forward* 10 mM, *Primer Reverse* 10 mM, air bebas nuklease, RNA cetakan, dan *iScript Reverse Transcriptase for one step*. Volume akhir 25,0 μ l. Untuk kontrol negatif, tidak ditambahkan RNA cetakan. Komposisi dan perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5. Posisi dan spesifikasi primer gen SOX2 dan PUM1 dapat dilihat pada Lampiran 7 dan 11. Kondisi RT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum.

1. Untuk gen SOX2

- | | |
|--------------------------|--------------------------------|
| a. Reverse Transcriptase | : 50 ⁰ C ; 10 menit |
| b. Pra-siklus | : 95 ⁰ C ; 5 menit |

- | | | |
|-------------------|----------------------|---------------------------------|
| c. Siklus 39 kali | : Tahap denaturasi | : 95 ⁰ C ; 10 detik |
| | : Tahap pelekatan | : 58,8 ⁰ C; 10 detik |
| | : Tahap perpanjangan | : 72 ⁰ C ; 30 detik |
| d. Pasca-siklus | : Pasca perpanjangan | : 95 ⁰ C ; 1 menit |
| | | : 55 ⁰ C ; 1 menit |

2. Untuk gen PUM1

- | | | |
|--------------------------|----------------------|--------------------------------|
| a. Reverse Transcriptase | | : 50 ⁰ C ; 10 menit |
| b. Pra-siklus | | : 95 ⁰ C ; 5 menit |
| c. Siklus 39 kali | : Tahap denaturasi | : 95 ⁰ C ; 10 detik |
| | : Tahap pelekatan | : 55 ⁰ C ; 10 detik |
| | : Tahap perpanjangan | : 72 ⁰ C ; 30 detik |
| d. Pasca-siklus | : Pasca perpanjangan | : 95 ⁰ C ; 1 menit |
| | | : 55 ⁰ C ; 1 menit |

Kemudian untuk mengkonfirmasi gen dilakukan elektroforesis dengan akrilamid konsentrasi 8% yang terdiri dari 3,3 ml air, 0,375 ml dapar TBE (Tris Borat EDTA) 10 x, 1 ml larutan akrilamid, 42,5 µl ammonium persulfat 10% dan 4,25 µl TEMED. Larutan tersebut dihomogenkan dengan pipet sebanyak 4x dan dengan cepat dituang ke dalam cetakan gel, sisir dipasang, lalu didiamkan hingga membeku selama 15–20 menit, kemudian sisir diangkat dan cetakan dipindahkan ke wadah elektroforesis yang diberi dapar TBE hingga menggenangi permukaan gel akrilamid. Setelah penambahan TEMED 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. Elektroforesis dinyalakan dan diatur dengan tegangan sebesar 110 volt dan arus listrik 400 A selama 50 menit. Setelah selesai dijalankan, gel akrilamid direndam selama 1 menit dalam larutan etidium bromida yang telah diencerkan dengan TBE 1x. Pita-pita ampikon diamati melalui UV transilluminator pada panjang gelombang 590 nm dengan pelindung (*hood*) dan difoto dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer sehingga dapat diedit dan dicetak.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Belum Disortir

Medium yang digunakan untuk kultur sel yaitu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) *high glucose* dan *Conditioned Medium* (CM) yang ditambah dengan *Fetal Bovine Serum* 10% (FBS) yang berguna untuk membantu proliferasi dan melekatkan sel pada *flask*. Penambahan *penstrep* bermanfaat untuk mencegah kontaminasi. Medium dihomogenkan dengan cara membolak-balikan tabung secara perlahan untuk menghindari timbulnya buih. Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah sel CS09 kanker payudara yang diambil dalam waktu kurang lebih satu jam setelah operasi pengangkatan tumor untuk mengurangi resiko sel mati sebelum dilakukan isolasi. Kemudian sel disimpan pada keadaan dingin (2°C – 5°C) untuk diproses oleh tim IHVCB-UI sebelum dapat dikultur dengan menggunakan medium DMEM *high glucose* pada *flask* T-75. Pergantian medium dilakukan tiga hari sekali agar pertumbuhan sel terjaga dengan baik (Gambar 4.1). Pertumbuhan sel CS09 kanker payudara tersebut sangat cepat sehingga dilakukan proses subkultur beberapa kali agar pertumbuhan sel tidak terhambat.

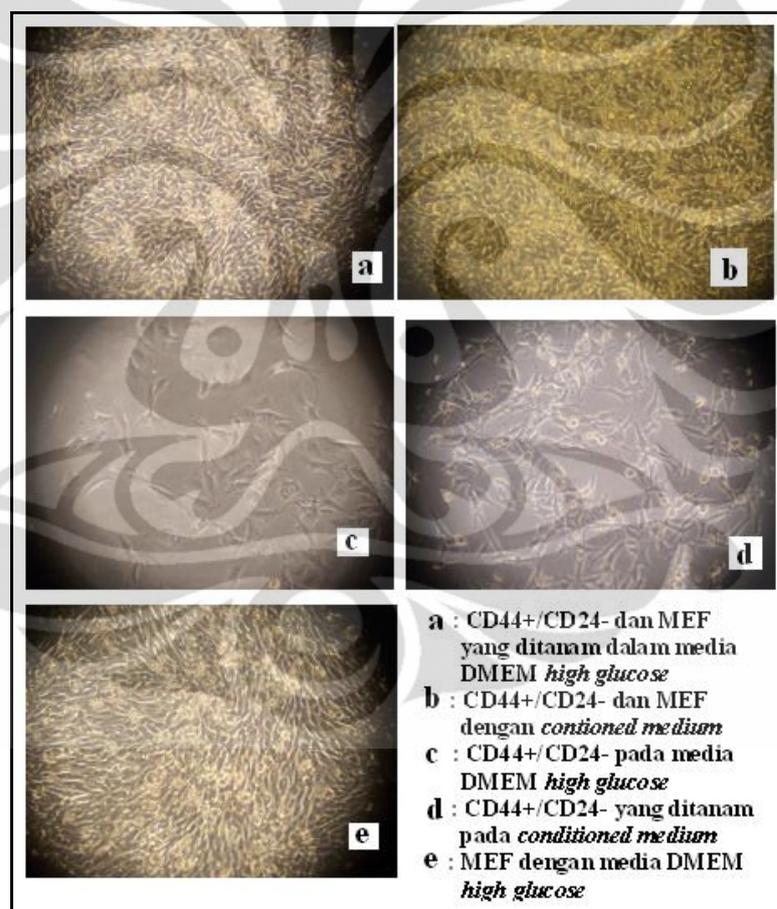


Gambar 4.1 Pertumbuhan sel CS09 kanker yang belum disortir

4.2 Kultur Sel CS09 Kanker Payudara yang Telah Disortir

Pemanenan dan penyortir sel CS09 kanker payudara dilakukan setelah sel dihitung terlebih dahulu dengan menggunakan *hemocytometer*. Jumlah sel CD44+/CD24- disamakan menjadi 20.000 sel ditanam pada *plate* serta diberikan

perlakuan yang berbeda (Gambar 4.3). Pada pengamatan secara mikroskopik dari hasil kultur sel diamati bahwa densitas sel punca kanker payudara yang dikultur dengan MEF menggunakan CM (Gambar 4.1b) lebih tinggi dibandingkan dengan yang dikultur dengan MEF menggunakan DMEM *high glucose* (Gambar 4.1a). Sedangkan densitas sel punca pada kondisi kultur dengan MEF (Gambar 4.1a dan 4.1b) lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak dikultur dengan MEF (Gambar 4.1c dan 4.1d). Selanjutnya densitas sel punca yang dikultur dengan CM (Gambar 4.1c) lebih tinggi dibandingkan dengan yang dikultur dengan DMEM *high glucose* (Gambar 4.1d).



Gambar 4.2. Pertumbuhan sel CS09 kanker yang telah disortir.

Proses kultur harus diamati setiap hari karena MEF memiliki tingkat propagasi sel yang cepat sehingga akan lepas dari dasar *well* pada saat *feeder layer* terlalu *confluent*. *Feeder cells* yang terlepas akan sulit dibedakan dengan sel

punca sehingga menyulitkan proses pengujian selanjutnya. Sel punca kanker payudara di dalam kondisi kultur *in vitro* ditandai dengan sel yang memiliki morfologi bulat dan tidak membentuk fibroblas yang menjalar pada permukaan *flask*. Sel punca tersebut juga dapat membentuk *mamospheres* yaitu sel punca yang berdekatan dan membentuk gerombolan sel yang tidak melekat melainkan melayang pada medium.

Hasil penelitian sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa *feeder layer* memegang peranan penting didalam proliferasi sel dan mempertahankan pluripotensi sel dengan cara menyediakan *surface* yang sesuai tempat melekat sel (Reubinoff et al., 2000, Thomson et al., 1998). Selain *feeder layer*, CM dapat ikut mempertahankan pluripotensi sel yang terlihat dari pertumbuhan sel punca pada CM yang lebih maksimal sehingga sel lebih cepat memenuhi permukaan *feeder layer* dibandingkan dengan menggunakan DMEM *high glucose*.

4.3 Analisis Ekspresi CD44⁺/CD24⁻ dengan Spektrofluorometri

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan sampel sel CS09 kanker yang dipanen setelah melalui proses kultur pada kondisi yang berbeda. Pengukuran sel yang mengekspresikan CD24⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan pengukuran sel yang mengekspresikan CD44⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm.

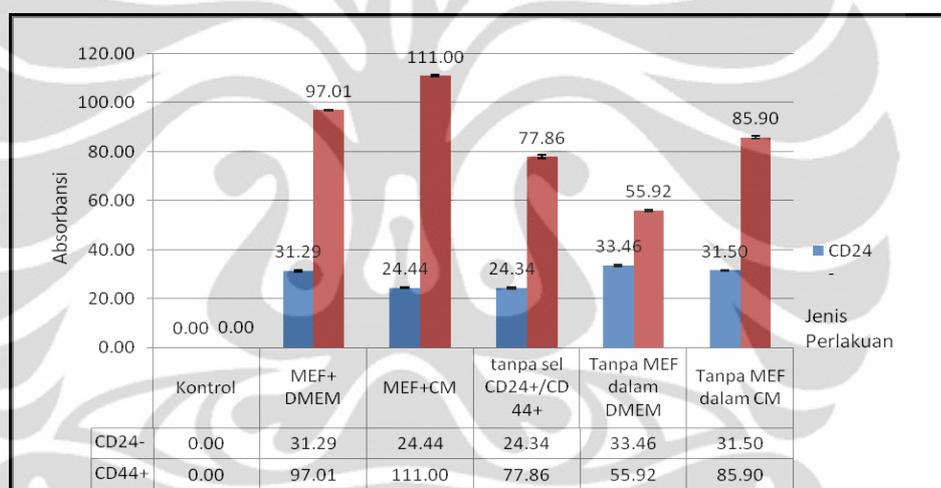
Pada hasil pengukuran didapatkan nilai pengukuran untuk ekspresi CD24⁺ yaitu (a) 31,29 pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan MEF menggunakan DMEM *high glucose*; (b) 24,44 pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan MEF menggunakan CM; (c) 33,46 pada sel punca kanker DMEM *high glucose* tanpa proses ko-kultur dengan MEF; dan (d) 31,50 pada sel punca kanker yang dikultur menggunakan CM tanpa proses ko-kultur dengan MEF.

Sementara itu, nilai pengukuran absorbansi untuk ekspresi CD44⁺ yaitu (a) 97,01 pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan MEF menggunakan DMEM *high glucose*; (b) 111,00 pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan MEF menggunakan CM; (c) 56,90 DMEM *high glucose* tanpa proses ko-kultur dengan MEF; dan (d) 85,90 pada sel punca kanker yang dikultur menggunakan CM. Hasil

pengukuran untuk ekspresi CD24⁺ dan CD44⁺ pada sel MEF sebagai kontrol (e) yaitu 24,34 dan 77,86 (Tabel 4.1). Nilai yang ditampilkan adalah nilai setelah dikurangi nilai *background* dan nilai kontrol negatif. Untuk data pengukuran yang lebih lengkap dapat dilihat pada (Lampiran 6).

Tabel 4.1. Hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁻

No.	Jenis Perlakuan	Absorbansi (A)	
		CD24 ⁺	CD44 ⁺
a.	Sel+MEF+DMEM <i>high glucose</i>	31,29	97,01
b.	Sel +MEF+CM	24,44	111,00
c.	Sel+DMEM <i>high glucose</i>	33,46	56,90
d.	Sel+CM	31,50	85,90
e.	Hanya MEF menggunakan DMEM <i>high glucose</i>	24,34	77,86



Gambar 4.3. Kurva hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁻

Al Hajj et al. (2003) melaporkan bahwa sel punca kanker payudara memiliki penanda permukaan yang spesifik yaitu CD44⁺ dan CD24⁻ sehingga ekspresi CD44⁺/CD24⁻ dapat dijadikan suatu parameter untuk menilai pluripotensi sel kanker payudara yang dikultur pada berbagai kondisi tersebut. Nilai serapan CD24⁺ yang rendah menunjukkan jumlah sel yang memiliki penanda permukaan CD24⁺ lebih rendah dibandingkan dengan sel tidak memiliki penanda permukaan tersebut (CD24⁻). Nilai serapan CD44⁺ yang tinggi menunjukkan jumlah sel yang memiliki penanda permukaan CD44⁺ lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang tidak memiliki penanda permukaan tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian, jumlah sel yang tidak mengekspresikan penanda permukaan CD24 namun mengekspresikan penanda permukaan CD44 pada sel yang diko-kultur dengan MEF di dalam CM lebih tinggi dari hasil pengukuran serapan pada perlakuan lainnya. Selanjutnya, jumlah sel yang tidak mengekspresikan penanda permukaan CD24 namun mengekspresikan penanda permukaan CD44 pada sel yang diko-kultur dengan MEF lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak di ko-kultur dengan MEF. Selain itu, jumlah sel yang tidak mengekspresikan penanda permukaan CD24 pada sel yang dikultur pada CM lebih tinggi daripada yang di kultur dengan DMEM *high glucose*.

Oleh karena itu, berdasarkan hasil pengukuran dengan metode spektrofлуoresensi tersebut dapat disimpulkan bahwa MEF dan CM dapat mempertahankan pluripotensi sel kanker payudara yang ditandai dengan jumlah sel yang mengekspresikan penanda permukaan CD44+/CD24- yang lebih tinggi. Sifat pluripotensi dari sel punca kanker payudara dipertahankan oleh MEF dengan cara menyediakan suatu *surface* yang ideal bagi sel punca kanker untuk menempel sehingga mencegah sel terdiferensiasi membentuk fibroblast. Sedangkan CM mempertahankan pluripotensi dengan cara mensekresikan faktor pertumbuhan tertentu. Nilai kontrol menunjukkan nilai tinggi karena sel punca embrionik mencit memiliki juga memiliki penanda permukaan CD24 dan CD44. Hal ini telah diteliti pada penelitian sebelumnya yang terkait dengan proses transisi epitelial-mesenkimal pada proses propagasi sel (Brown et al., 2011).

4.4 Ekstraksi Total RNA dan Analisis Kemurnian Total RNA

Pemanenan sel dilakukan dengan *collagenase IV* yang berfungsi melepaskan sel punca tanpa melepaskan MEF. Jumlah sel disamakan pada tiap sampel menjadi $7,5 \times 10^4$ sel dan diekstraksi total RNA. Penyeragaman jumlah sel sebelum diekstraksi dilakukan sebagai langkah awal dalam menormalisasi RNA. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan kit dari Qiagen (RNeasy Mini Handbook, 2006). Pelet sel ditambahkan buffer RLT -yang sebelumnya telah ditambahkan β -merkaptioetanol- sebanyak 350 μ l. Buffer RLT mengandung garam guanidium tiosianat yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein yang merupakan komponen penyusun membran sel dengan merangsang transfer *non*

polar group ke dalam air sehingga akan meningkatkan sifat lipofilisitasnya. Sedangkan dengan adanya β -merkaptotanol yang merupakan agen pereduksi yang efektif dalam menghambat kerja dari Rnase yaitu 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). Buffer RW1 mengandung guanidium tiosianat dan etanol agar pemecahan sel dan pengendapan materi asam nukleat berlangsung lebih efektif. Penambahan etanol ini bertujuan untuk mengendapkan materi asam nukleat dan menghilangkan kontaminasi protein.

Uji selanjutnya adalah melakukan uji kemurnian terhadap total RNA yang sudah diekstraksi dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 260 nm. 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). Hasil pengukuran konsentrasi total RNA CS09 kanker dari (a) sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM; (b) sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM; (c) kontrol dimana hanya terdapat MEF di dalam DMEM tanpa sel punca kanker; (d) sel yang di kultur dengan CM; (e) sel yang di kultur dengan DMEM berturut-turut adalah 578,33 ng/ul, 3,53 ng/ul, 9,46 ng/ul, 11,93 ng/ul dan 92,06 ng/ul dengan nilai A260/280 untuk berturut-turut adalah 1,67, 0,96, 2,19, 2,04, dan 2,19 (Tabel 4.2). Data tersebut kemudian digunakan untuk menghitung jumlah larutan pada proses *real time* PCR (Lampiran 5).

Tabel 4.2. Hasil pengukuran konsentrasi RNA sel CS09 kanker payudara

No.	Perlakuan	Konsentrasi RNA (ng/ul)	Nilai A260/280
a.	Sel + MEF+DMEM <i>high glucose</i>	578,33	2,30
b.	Sel+MEF+CM	3,53	2,60
c.	Sel +DMEM <i>high glucose</i>	11,93	1,92
d.	Sel +CM	92,06	1,82
e.	hanya MEF+DMEM <i>high glucose</i>	9,46	2,01

4.5 Optimasi Menggunakan *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

Optimasi *real time* PCR dilakukan dengan menggunakan PCR *reverse transcriptase* konvensional yang dilakukan dengan satu langkah (*one step*) dimana proses *reverse transcription* dan proses PCR dilakukan dalam satu proses (*one tube*). Optimasi dilakukan dengan *real time* PCR berdasarkan pertimbangan efisiensi biaya dan waktu. Optimasi dengan *real time* PCR memerlukan waktu dan biaya yang mahal karena pengaturan suhu pada *real time* PCR hanya pada satu suhu sehingga proses PCR harus dilakukan berkali-kali untuk menemukan suhu optimum. Sehingga, optimasi dilakukan pada *reverse transcription* PCR konvensional yang paling mendekati *real time* PCR.

Reagen untuk *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan *OneStep* RT-PCR [Qiagen, Jerman] yang terdiri dari campuran enzim *Omniscript*, *Sensiscript* dan *HotStarTaq DNA polymerase* dalam dapar pH 9. *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. *HotstarTaqPolymerase* 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.

Hasil *real time* PCR dianalisis menggunakan *Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) dengan alat cetakan dan elektroforesis dari Biorad untuk mengetahui besar ampikon. Pada penelitian ini, dipilih gel akrilamid dengan konsentrasi 8% karena hasil ampikon yang diinginkan hanya sebesar 150–250 bp. Gel poliakrimid ini terbentuk dari polimerisasi akrilamid dan *cross-linking*nya yaitu bisakrilamid dengan ammonium persulfat sebagai inisiator dan TEMED sebagai katalis (Boyer, 2000). Primer yang digunakan untuk *One Step* RT-PCR adalah primer spesifik untuk gen SOX2 dan PUM1. Primer ini 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).

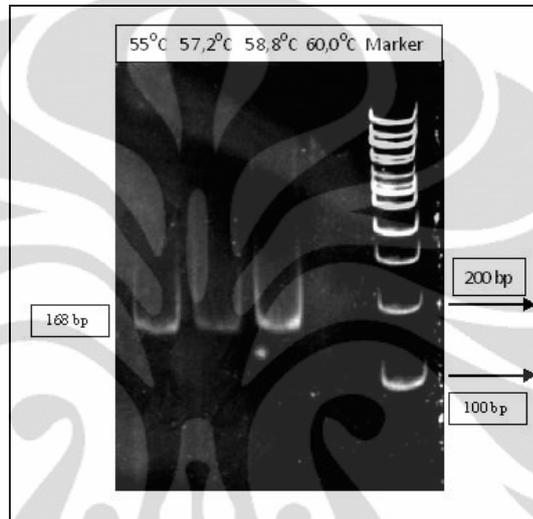
Suhu untuk tahap perlekatan digunakan suhu 55°C–65°C. Untuk proses pelekatan, harus dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk mendapatkan suhu optimum masing-masing primer. Pada umumnya suhu perlekatan optimum lebih rendah 5°C dari T_m tiap primer. T_m adalah temperature dimana 50% proses pelekatan antara 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, 57,2°C, dan 58,8°C dan 60,0°C.

Tabel 4.3. Hasil optimasi SOX2 dan PUM1

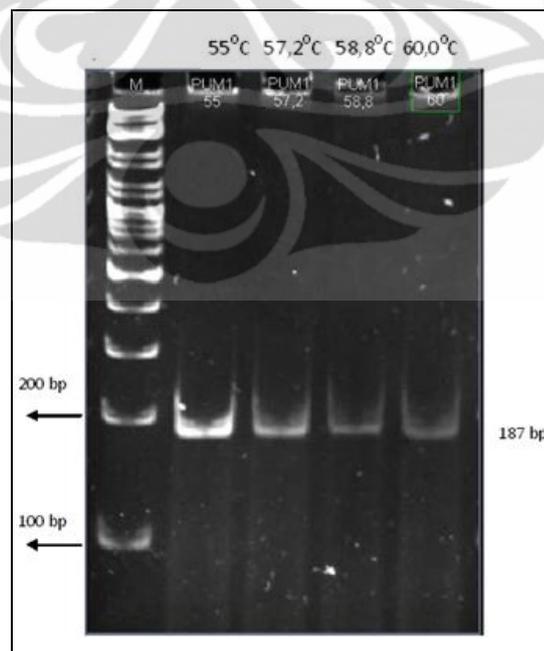
Gen	Suhu (°C)	Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel)
SOX2	55	1560.563
	57,2	1816.063
	58,9	3072.188
PUM1	55	3835.438
	57,2	2977.000
	58,8	1970.438
	60	2708.000

Hasil pengamatan amplikon gen SOX2 dengan suhu perlekatan 55°C, 57,2°C, 58,8°C dan 60,0 °C pada elektroforesis gel akrilamid 8 % menunjukkan terdapat pita spesifik yaitu sekitar 150 bp kecuali pada suhu 60,0 °C tidak terdapat pita. Hasil pengukuran intensitas pada ketiga suhu tersebut berturut-turut adalah 1816.063 pixel, 1560.563 pixel dan 1729.188 pixel (Tabel 4.3). Oleh karena itu suhu optimasi untuk gen SOX2 adalah 58,8°C dimana pada suhu ini memberikan intensitas pita yang cukup kuat dan menunjukkan satu pita spesifik pada ukuran sekitar 168 bp (Gambar 4.4). Hasil pengamatan amplikon gen *housekeeping*

PUM1 dengan suhu perlekatan 55°C , $57,2^{\circ}\text{C}$, $58,8^{\circ}\text{C}$ dan $60,0^{\circ}\text{C}$. Pada kelima suhu tersebut didapatkan pita spesifik yaitu pada ukuran sekitar 187 bp. Hasil pengukuran intensitas berturut-turut adalah 3835,438 pixel; 2977,000 pixel; 1970,438 pixel; 2708,000 pixel (Table 4.3). Dari hasil pengukuran intensitas diketahui bahwa suhu 55°C adalah suhu optimum untuk *housekeeping* PUM1 karena memberikan intensitas paling kuat (Gambar 4.5).



Gambar 4.4. Hasil optimasi PCR untuk SOX2



Gambar 4.5. Hasil optimasi PCR untuk PUM1.

4.6 Analisis Ekspresi Gen SOX2 Menggunakan *Real Time Polymerase Chain Reaction*

Uji selanjutnya adalah mengukur tingkat ekspresi gen secara kuantitatif dengan menggunakan *real time PCR* pada suhu yang didapatkan dari hasil optimasi. Data yang didapatkan dianalisis dengan metode $\Delta\Delta C_T$ karena tidak ada sel yang dapat dijadikan standar. Nilai C_T pada amplifikasi gen SOX2 yang diperoleh untuk masing-masing perlakuan adalah (a) 34,020 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM; (b) 28,830 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM; (c) 31,775 untuk kondisi kontrol dimana hanya terdapat MEF di dalam DMEM tanpa sel punca kanker; (d) 32,95 untuk sel yang di kultur dengan DMEM; dan (e) 30,82 untuk sel yang di kultur dengan CM.

Tabel 4.4. Nilai C_T dan ΔC_T dari hasil *real time PCR* untuk berbagai perlakuan.

No .	Jenis perlakuan	SOX2 C_T	PUM1 C_T	$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ housekeeping}$	$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ house keeping (setelah dikurangi dengan nilai kontrol MEF + DMEM)}$
a.	Sel +MEF+DMEM (Perlakuan 1)	34,01 34,03	37,86 39,06	-4,440	-5,975
	Mean	34,020	38,460		
b.	Sel +MEF+CM (Perlakuan 2)	29,23 28,43	35,57 37,68	-7,795	-9,330
	Mean	28,83	36,62		
c.	MEF + DMEM	29,37 34,18	30,20 30,28	1,535	-
	Mean	31,77	30,24		
d.	Sel+DMEM (kontrol untuk perlakuan no.1)	29,97 35,94	30,69 35,98	-0,380	-0,380 (Karena tidak ada pengaruh MEF)
	Mean	32,95	33,33		
e.	Sel+CM (kontrol untuk perlakuan no. 2)	31,04 30,61	32,80 33,85	-2,500	-2,500 (Karena tidak ada pengaruh MEF)
	Mean	30,82	33,32		

Nilai C_T pada amplifikasi gen PUM1 sebagai kontrol dalam diperoleh untuk masing-masing perlakuan adalah (a) 38,460 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM; (b) 36,62 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM; (c) 33,325 untuk kondisi kontrol dimana

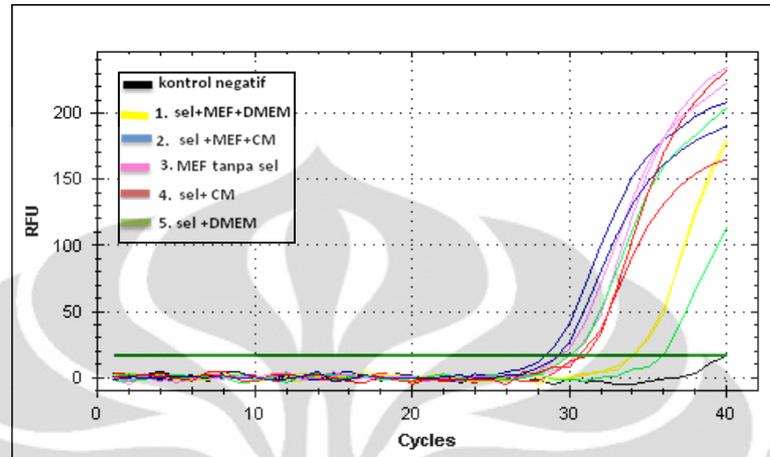
hanya terdapat MEF di dalam DMEM tanpa sel punca kanker; (d) 30,24 untuk sel yang di kultur dengan DMEM; dan (e) 33,32 untuk sel yang di kultur dengan CM. Kemudian dihitung nilai ΔC_T untuk masing-masing perlakuan yaitu (a) -4,440 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM; (b) -7,795 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM; (c) 1,535 untuk kondisi kontrol dimana hanya terdapat MEF di dalam DMEM tanpa sel punca kanker; (d) -0,380 untuk sel yang di kultur dengan DMEM (kontrol perlakuan a); (e) -2,500 untuk sel yang di kultur dengan CM (kontrol perlakuan b). Nilai ΔC_T untuk perlakuan yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM dan CM harus dikurangi dengan nilai kontrol MEF di dalam DMEM dengan tujuan menghilangkan pengaruh MEF sehingga data yang dihasilkan lebih akurat. Nilai ΔC_T untuk perlakuan yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM dan CM setelah dikurangi dengan dengan nilai kontrol MEF di dalam DMEM berturut-turut adalah -5,975 dan -9,330 (Tabel 4.4).

Tabel 4.5 Hasil normalisasi gen SOX2 dengan *housekeeping* PUM1 dengan metode analisis *comparative threshold cycle analysis* ($\Delta\Delta C_T$)

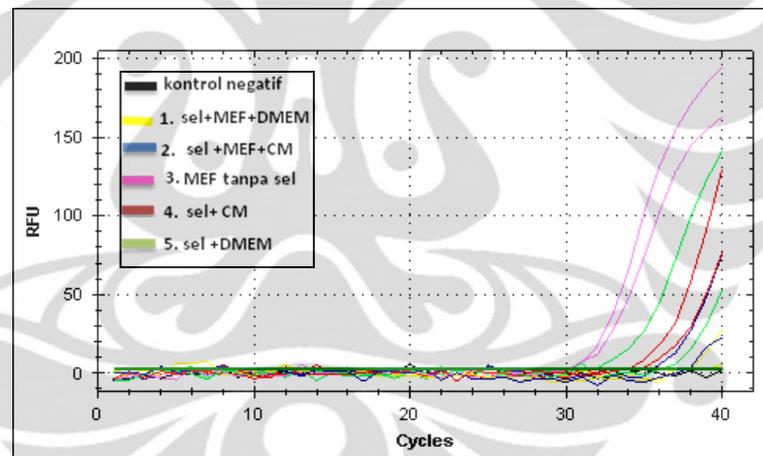
No	Jenis perlakuan	$(\Delta\Delta C_T) = \Delta C_T$ kontrol - ΔC_T perlakuan	Level Perbandingan Ekspresi Eficiency 100% ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)
a.	Sel +MEF+DMEM (Perlakuan 1)	5,59	48,33
b.	Sel +MEF+CM (Perlakuan 2)	6,38	83,28

Kemudian dapat diperoleh nilai $\Delta\Delta C_T$ untuk masing-masing perlakuan yaitu (a) 5.59 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM; (b) 6,38 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM. Sehingga dapat diperoleh perbandingan level ekspresi gen SOX2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) relatif terhadap kontrol masing-masing perlakuan yaitu sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM 48,33 kali dari kontrol, sedangkan untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM 83,28 kali dari kontrol. Berdasarkan data tersebut ekspresi SOX2 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM lebih tinggi daripada yang diko-kultur

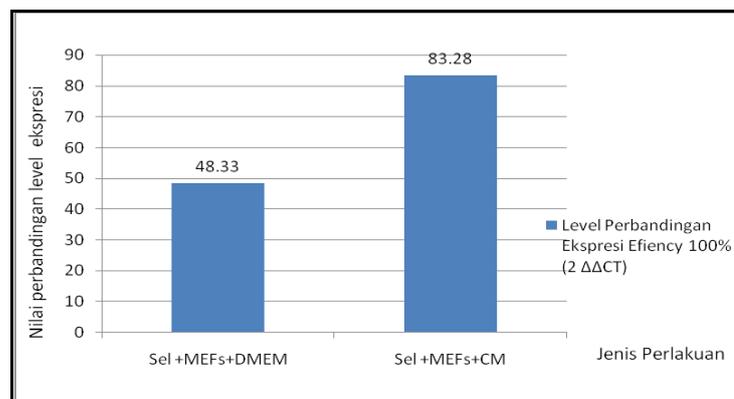
dengan MEF dengan menggunakan DMEM (Tabel 4.5). Kurva *melt kurve* dan *melt peak* gen SOX2 dan PUM1 yang didapatkan dari *real time* PCR dapat dilihat pada Lampiran 8.



Gambar 4.6. Kurva amplifikasi gen SOX2.



Gambar 4.7. Kurva amplifikasi gen PUM1.



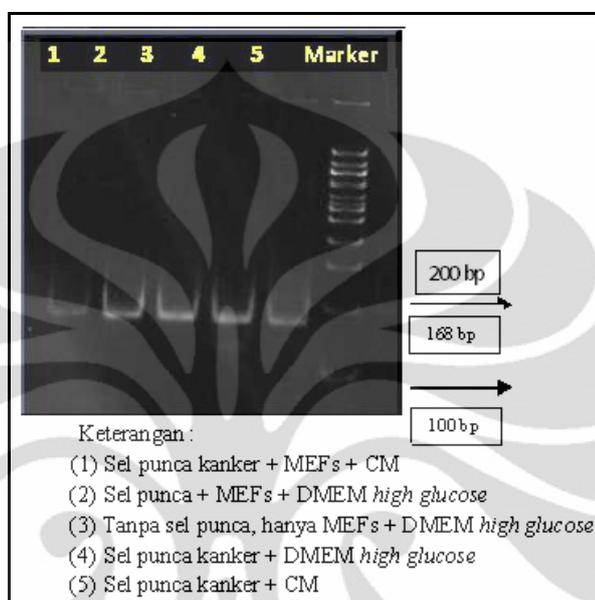
Gambar 4.8. Kurva perbandingan level ekspresi gen SOX2

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekspresi SOX2 meningkat pada sel punca kanker dibandingkan dengan sel punca normal (Ornella, 2010). Penelitian lainnya menyebutkan bahwa SOX2 terkait dengan pluripotensi sel dan mampu menginduksi sel punca kanker dari sel yang telah terdiferensiasi yaitu fibroblast (Takashi et al., 2007). Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa tingkat ekspresi relatif gen SOX2 terhadap kontrol meningkat pada sel yang di ko-kultur dengan menggunakan MEF menggunakan medium CM dibandingkan dengan sel yang di ko-kultur dengan MEF menggunakan medium DMEM (Gambar 4.8). Namun, sistem ko-kultur MEF dengan medium DMEM lebih baik dalam mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara dibandingkan dengan ditanam di dalam medium CM atau DMEM saja tanpa ko-kultur dengan MEF.

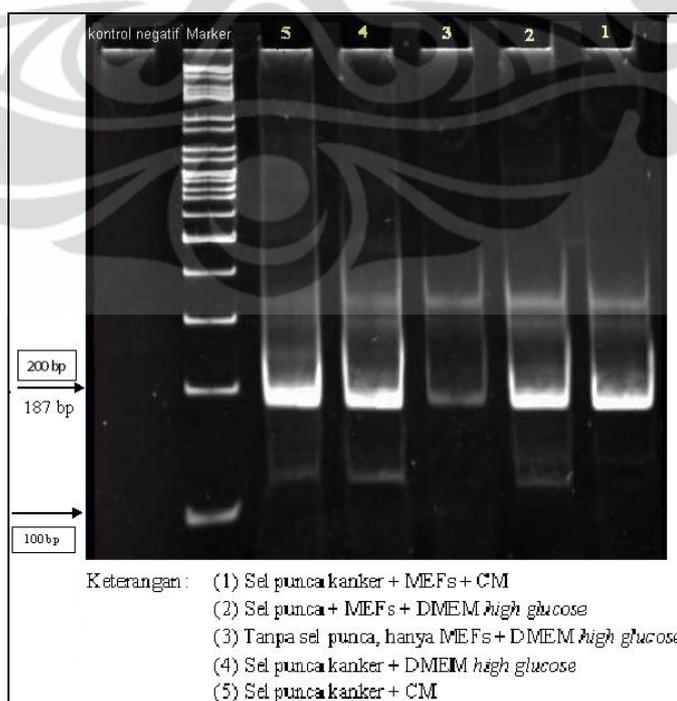
Kemudian hasil *real time* PCR di-*running* pada gel akrilamid 8% untuk mengkonfirmasi bahwa gen yang di amplifikasi pada proses *real time* PCR adalah gen SOX2 dan PUM1. Hasil yang didapatkan dari proses elektroforesis tersebut menunjukkan pita pada ukuran sekitar 168 dan 187 bp yang diasumsikan sebagai gen SOX2 dan PUM1 (Gambar 4.9 dan 4.10). Namun, dapat diamati pula adanya pita-pita tipis di daerah berukuran antara 100 bp sampai 150 bp yang diduga sebagai hasil amplifikasi non spesifik. Hal tersebut, kemungkinan disebabkan oleh belum optimumnya hasil dari *real time* PCR yang digunakan. Untuk mendapatkan hasil yang optimum perlu dilakukan optimasi terhadap alat *real time* PCR yang digunakan sehingga dapat mencegah terjadinya amplifikasi yang tidak spesifik. Kondisi yang ideal yang didapatkan dari hasil optimasi tidak dapat dilepaskan dari beberapa parameter diantaranya adalah konsentrasi reagen, jumlah siklus, primer, kualitas RNA cetakan, PCR enhancers, dan kontaminasi (Bustin, 2002).

Namun, adanya beberapa keterbatasan menyebabkan optimasi dilakukan dengan menggunakan RT-PCR. Keterbatasan tersebut yaitu tidak adanya pengaturan gradien suhu pada *real time* PCR sehingga tidak memungkinkan amplifikasi pada berbagai suhu dalam waktu yang bersamaan. Apabila ingin melakukan optimasi pada *real time* PCR maka amplifikasi harus dicoba pada masing-masing suhu dalam waktu yang berbeda. Hal ini sulit untuk dilakukan mengingat terbatasnya jumlah RNA dan reagen yang dimiliki. Oleh karena itu,

optimasi pada *reverse transcriptase* PCR dipilih sebagai pendekatan paling mirip dari *real time* PCR sehingga suhu *annealing* yang dipakai pada penelitian ini adalah suhu yang dianggap paling mendekati suhu optimal sebenarnya bila dilakukan optimasi dengan menggunakan *real time* PCR.



Gambar 4.9. Konfirmasi gen SOX2 dengan elektroforesis



Gambar 4.10. Konfirmasi gen PUM1 dengan elektroforesis

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Modifikasi ko-kultur sel punca CS09 kanker payudara dengan menggunakan *feeder layer Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) dapat mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara. Ko-kultur dengan MEFs menggunakan *conditioned medium* (CM) sebagai media merupakan kondisi kultur terbaik dalam mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara tersebut berdasarkan ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- dan ekspresi gen SOX2.
2. Ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- pada sel yang diko-kultur dengan MEF di dalam CM lebih tinggi dari pada perlakuan yang tidak diko-kultur yang dianalisis dengan metode spektrofлуoresensi.
3. Ekspresi gen SOX2 untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan DMEM meningkat 48,33 kali dari kontrol, sedangkan untuk sel yang diko-kultur dengan MEF dengan menggunakan CM meningkat 83,28 kali dari kontrol. Hasil tersebut didapatkan dari analisis menggunakan metode *real time* PCR.

5.2 SARAN

1. Untuk mendapatkan level ekspresi gen yang lebih akurat perlu dilakukan pengukuran level RNA menggunakan *real time* RT PCR secara triplo atau lebih.
2. Untuk mendapatkan amplifikasi yang lebih spesifik perlu dilakukan optimasi dengan menggunakan alat *real time* RT PCR yang digunakan.
3. Kualitas CM perlu ditingkatkan dengan perlakuan iradiasi atau dengan penambahan mitomisin C sehingga CM dapat digunakan untuk kultur yang optimal dari sel punca kanker payudara tanpa menggunakan MEF sebagai upaya mengembangkan model kultur *xenofree* pada masa mendatang.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. 10 Juni 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/132-enam-dan-makanan-sehat-cegah-kanker-sejak-dini.html>.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (Ed. ke-3). New York: Garland Publishing, Inc.
- Al Hajj, M., Wicha M.S., Hernandez A.B., Morrison S.J., dan Clarke M.F. (2003). Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983–3988.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M. A., Eldor I, J. dan Thomson, J. A. (2000). *Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture*. *Dev. Biol.* 227, 271–278.
- Application Manual*. (1995). Germany: Boehringer Mannheim GmbH Biochemical.
- Azamris, Arif, W., dan Darwin, E. (2003). *Eksresi CD44 pada jaringan tumor karsinoma payudara*. *Cermin Dunia Kedokteran*, 139, 27–31.
- Bapat, S.A. (2009). *Cancer Stem Cells: Identification and Target*. New York: John Wiley and sons.
- Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C. and Hayek, A. (2005). *Activin a Maintains Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells in the Absence of Feeder Layers*. *Stem Cells* 23, 489–495.
- Bellanti, J. A. (1993). *Imunologi III (A. Samik Wahab, Penerjemah)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 96–113, 173–179.
- Bolodeoku, J. *PCR Analysis of CD44 Variant in Tumor*. *Methods in Molecular Medicine*, 16, 189.
- 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
- Brown L.R., Reinke L.M., Damerow M. S., Perez D., Chodosh L. A., Jing Y., dan Chonghui C. (2011). CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *J. Clinical Investigation.* 121, 1064–1074
- Dong, C., Wilhelm, D., dan Koopman, P. (2004). SOX Genes and Cancer. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 2, 442–447.
- 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.
- Franks, F. (1993). *Protein Biotechnology.* US: The Humana Press Inc.
- Gale, T. (2005). Housekeeping Genes. *Dalam: Gale, Thomas. World of Genetics.* US: Thomas Corporation.
- 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., (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.
- Horiguchi, K, Toi, M., Horiguchi, S., Sugimoto, M., Naito, Y., Hayashi, Y., Ueno, T., Ohno, S., Funata N., Kuroi, K., Tomita, M. dan Eishi, Y. (2010). Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and. *J Med Dent Sci;* 57 : 165–175 .

- Hugget, J., (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 1–6.
- James, D., Levine, A. J., Besser, D. dan Hemmati-Brivanlou, A. (2005). *TGF{beta}/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells development*, 132, 1273–1282.
- 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 Immunoflourosensi*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI.
- 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. (2008). Identification of Genes for Normalization of Real-Time RT-PCR Data in Breast Carcinomas. *BMC Cancer.* 8, 20.
- Motari, E. E., Zheng, X., Sue, X., Liuc Y., Kvaratskheliad M., Freitas M., Wanga P. G., (2009). Analysis of recombinant CD24 glycans by MALDI-TOF-MS reveals prevalence of sialyl-T antigen. *American Journal of Biomedical Science*, 1, 1-11.
- 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.
- NanoDrop 2000 Spectrophotometer User's Manual*. (2008). Delaware: Thermo Fisher Scientific
- National Center of Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698. 12 Mei 2011.
- Ornella A. (2010). *Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook*. (2008).US: Qiagen Group.

- Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh.* (2006). California: Biorad Laboratories, Inc.
- Radonic, A., (2004). Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.
- Revillion, F., (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.
- RNeasy Mini Handbook.* (2006). US: Qiagen Group.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (Ed. ke-2). NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. dan Brivanlou, A (2004). Maintenance of Pluripotency In Human And Mouse Embryonic Scells Through Activation of Wnt Signaling by a Pharmacological GSK Specific Inhibitor. *Nat. Med.* 10, 55–63.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. and Benvenisty, N. (2000). Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11307–11312
- Takahashi, K. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 131, 5, 861–872.
- Thomson, J.A., Eldor, I., J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. dan Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tiffany M.P., William, H. McBride, Frank, P.. (2006). The Response of CD24-/low/CD44+ Breast Cancer - Initiating Cells to Radiatio. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 24, December 20.
- Tsukamoto, T., Inada, K., Tanaka, H. (2004). "Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia." *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130 (3): 135–45.

- Vandesompele, J., (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.
- Xie, C.Q., Lin, G., Luo, K.L., Luo, S.W., dan Lu, G.X. (2004). Newly Expressed Proteins of Mouse Embryonic fibroblasts Irradiated to be Inactive. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 315,581–588.
- Xu C., Inokuma M.S., Denham J. (2001) *Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells*. *Nature Biotechnology* 19, 971–974
- Wang W.C., Lin F.M., Chang W.C., Lin K.Y., Huang H.D., Lin N.S. 2009. miRExpress: Analyzing High-Throughput Sequencing Data for Profiling Microrna Expression. *BMC Bioinformatics.*;10: 328.
- Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M. et al. (2005). Noggin and β FGF Cooperate to Maintain The Pluripotency of Human Embryonic Stem Cells In The Absence of Feeder Layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 934–942.
- 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.
- 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.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C. D., Carlson M.D., Ambudkar, S.V. dan Varticovski, L. (2008). *BRCA1* Breast Tumors Contain Distinct CD44+/CD24- and CD133+ Cells With Cancer Stem Cell Characteristics. *Breast Cancer Res.* 10, 1, R10

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	
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

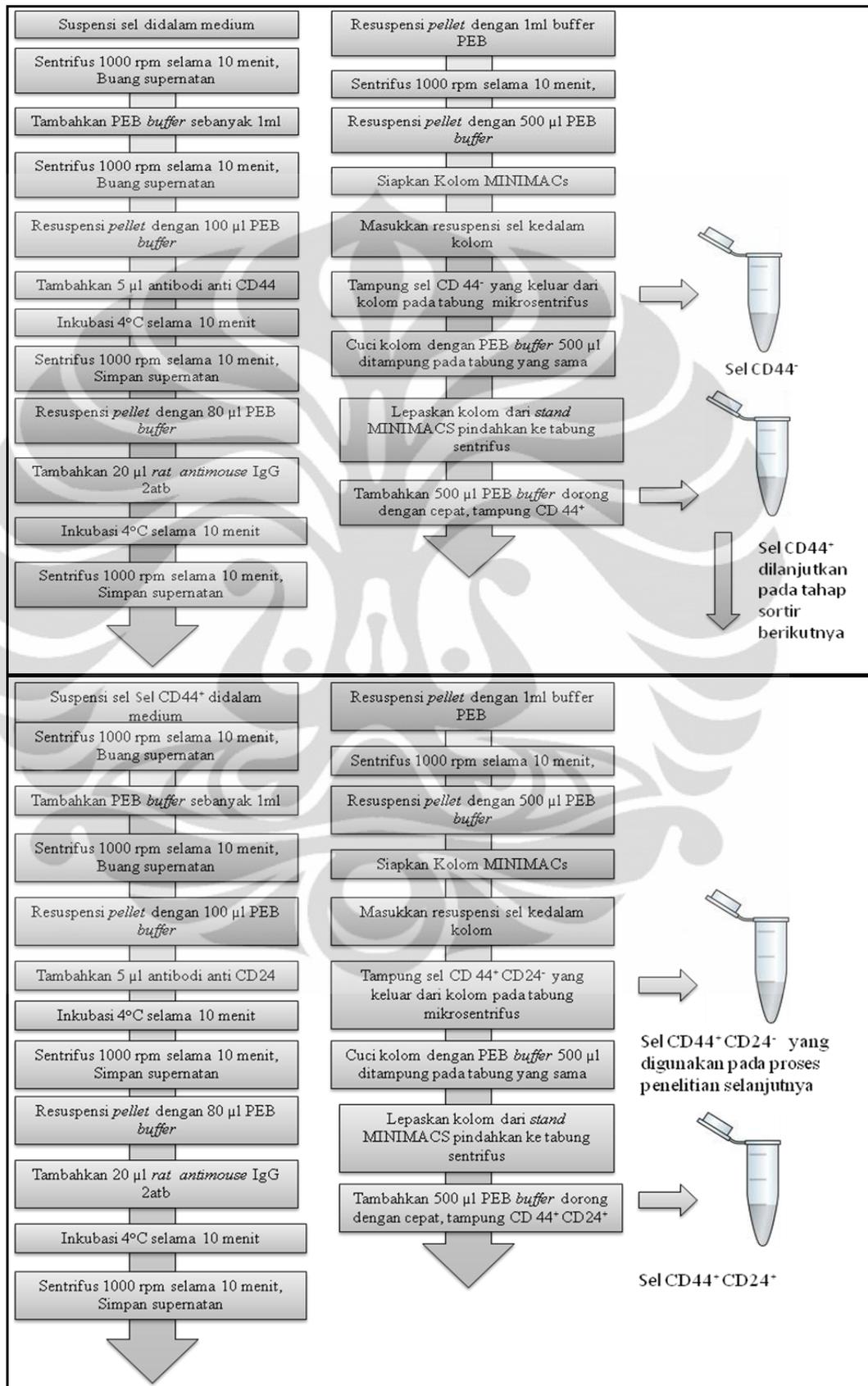
Lampiran 2. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	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.
2.	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.
3.	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°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Larutan APS (<i>Ammonium Per Sulfate</i>) 10%	Sebanyak 10 g <i>ammonium per sulfate</i> dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.
5.	Larutan stok <i>Crystal Violet</i> 1,6 ug/ul	Sebanyak 32 mg <i>Crystal Violet</i> dilarutkan dalam 20 mL akuademineralisata hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruang.
6.	Larutan gliserol 30 %	Sebanyak 30 mL larutan gliserol 100% ditambahkan akuabides hingga tepat 100 mL.
7.	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°C, tekanan 2 atm selama 15 menit.
8.	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°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Larutan disimpan pada suhu 2–8°C.

(Lanjutan)

9.	Larutan PBS (<i>Phosphate 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.
10.	Larutan Trypan Blue 10 X	Sebanyak 200 mg Trypan Blue dilarutkan dalam PBS hingga tepat 50 mL.
11.	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 pemipetan dan larutan disimpan pada suhu 2–4°C.
12.	Larutan RNase Inhibitor	Sebanyak 5 ul larutan stok <i>RNase Inhibitor</i> ditambahkan 5 ul air bebas nuklease. Homogenkan dengan pemipetan dan larutan disimpan pada suhu 2–4°C
13.	Larutan Stok Primer SOX2 F 500 uM	Sebanyak 156,4 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.
14.	Larutan Stok Primer SOX2 R 500 uM	Sebanyak 93,8 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.
15.	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.
16.	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.
17	Larutan BSA /PBS 1%	BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>) 1 gram dalam 100 ml PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

[Sumber : Sambrook, J., et al., 1989, Ausubel, 2001]

Lampiran 3. Skema proses sortir sel dengan MINIMACs *cells separator*

Lampiran 4. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses *reverse transcriptase* PCR dan *real time* 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	x ul	1,74 ng/ul
Volume akhir		10 ul	

Isi dari komponen iScript™ One-Step RT-PCR Kit

Komposisi	Volume	Konsentrasi Akhir
2X SYBR® Green RT-PCR Reaction Mix	12,5 µl	1x
Primer forward	0,75 µl	0,03 µM
Primer reverse	0,75 µl	0,03 µM
Air bebas nuklease	X µl	-
Cetakan RNA	Y µl	a ng/ µl
iScript Reverse Transcriptase for One step RT-PCR	1 µl	-
Volume Akhir	25 µl	

Reagen	Deskripsi
iScript Reverse Transcriptase for One Step RT-PCR	Optimasi 50Xformulasi MMLV <i>Reverse Transcriptase</i> untuk prosedur one step RT-PCR
2x SYBR® Green RT-PCR <i>Reaction Mix</i>	2X buffer yang mengandung 0,4 mM untuk setiap dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), magnesium klorida, iTag DNA polymerase, 20nM fluorescein, SYBR® Green I <i>dye</i> , stabiliator

Lampiran 5. Perhitungan konsentrasi RNA yang digunakan pada *real time* PCR

Perhitungan konsentrasi RNA yang digunakan dalam real-time PCR Untuk konsentrasi RNA terkecil semua air dalam reaksi diganti dengan RNA sehingga : $3,53 \text{ ng} \times 10,5 \mu\text{l} = A \text{ ng} \times 25 \mu\text{l}$ $A \text{ ng} = 1,48 \text{ ng}$		
Perlakuan	Konsentrasi RNA (ng/ul)	Volum yang digunakan dalam reaksi
CD44+/CD24- dan MEF yang ditanam dalam media DMEM <i>high glucose</i>	578,33	Volume RNA: $578,33 \text{ ng} \times B \mu\text{l} = 1,48 \text{ ng} \times 25 \mu\text{l}$ $B \mu\text{l} = 2,94 \mu\text{l}$ Volume air = $10,5 \mu\text{l} - 2,94 \mu\text{l}$ = $7,06 \mu\text{l}$
CD44+/CD24- dan MEF dengan <i>contioned medium</i>	3,53	Volume RNA = $10,5 \mu\text{l}$
CD44+/CD24- yang ditanam pada media DMEM <i>high glucose</i>	9,46	Volume RNA: $9,46 \text{ ng} \times B \mu\text{l} = 1,48 \text{ ng} \times 25 \mu\text{l}$ $B \mu\text{l} = 3,9 \mu\text{l}$ Volume air = $10,5 \mu\text{l} - 3,9 \mu\text{l}$ = $6,6 \mu\text{l}$
CD44+/CD24- yang ditanam pada media <i>contioned medium</i>	11,93	Volume RNA: $11,93 \text{ ng} \times B \mu\text{l} = 1,48 \text{ ng} \times 25 \mu\text{l}$ $B \mu\text{l} = 3,10 \mu\text{l}$ Volume air = $10,5 \mu\text{l} - 3,10 \mu\text{l}$ = $7,39 \mu\text{l}$
MEF dengan media DMEM <i>high glucose</i>	92,06	Volume RNA: dari pengenceran sepersepuluh konsentrasi awal $9,206 \text{ ng} \times B \mu\text{l} = 1,48 \text{ ng} \times 25 \mu\text{l}$ $B \mu\text{l} = 4,02 \mu\text{l}$ Volume air = $10,5 \mu\text{l} - 4,02 \mu\text{l}$ = $10,09 \mu\text{l}$

Lampiran 6. Hasil pengukuran jumlah sel CD24⁺ dan CD44⁺ dari kultur sel punca CS09 kanker payudara yang telah disortir.

CD24+	Background (Bg) 0.832					
Perlakuan	Kontrol	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Absorbansi 1 (A1)	6,16	37,40	30,90	40,04	30,85	38,03
Absorbansi 2 (A2)	6,06	37,88	30,34	39,57	30,80	37,50
Absorbansi 3 (A3)	6,06	36,88	30,34	39,05	30,23	37,26
A1-Bg	5,33	36,57	30,07	39,21	30,02	37,20
A2-Bg	5,23	37,05	29,51	38,74	29,97	36,67
A3-Bg	5,23	36,05	29,51	38,22	29,40	36,43
Mean (Ax-Bg)	5,26	36,55	29,70	38,72	29,79	36,77
Mean (Ax-Bg)- Mean (Ax-Bg) untuk kontrol	-	31,29	24,44	33,46	24,53	31,51
Standar Error		0,289	0,187	0,286	0,199	0,226
CD 44+	Background (Bg) 0.035					
Perlakuan	Kontrol	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
Absorbansi 1 (A1)	1,51	98,56	112,53	57,10	78,12	86,64
Absorbansi 2 (A2)	1,38	97,98	113,04	56,98	79,08	88,17
Absorbansi 3 (A3)	1,36	98,73	111,67	57,91	80,63	87,14
A1-Bg	1,47	98,53	112,50	57,07	78,09	86,61
A2-Bg	1,35	97,95	113,01	56,95	79,04	88,14
A3-Bg	1,32	98,70	111,64	57,88	80,60	87,11
Mean (Ax-Bg)	1,38	98,39	112,38	57,30	79,24	87,28
Mean (Ax-Bg)- Mean (Ax-Bg) untuk kontrol	-	97,01	111,00	55,92	77,86	85,90
Standar Error		0.23	0.40	0.29	0.73	0.45

Keterangan : (a) Sel punca + MEFs + DMEM *high glucose*
 (b) Sel punca kanker + MEFs + CM
 (c) Sel punca kanker + DMEM *high glucose*
 (d) Sel punca kanker + CM
 (e) Tanpa sel punca, hanya MEFs + DMEM *high glucose*

Lampiran 7. Posisi dan urutan basa primer SOX2 dan PUM1

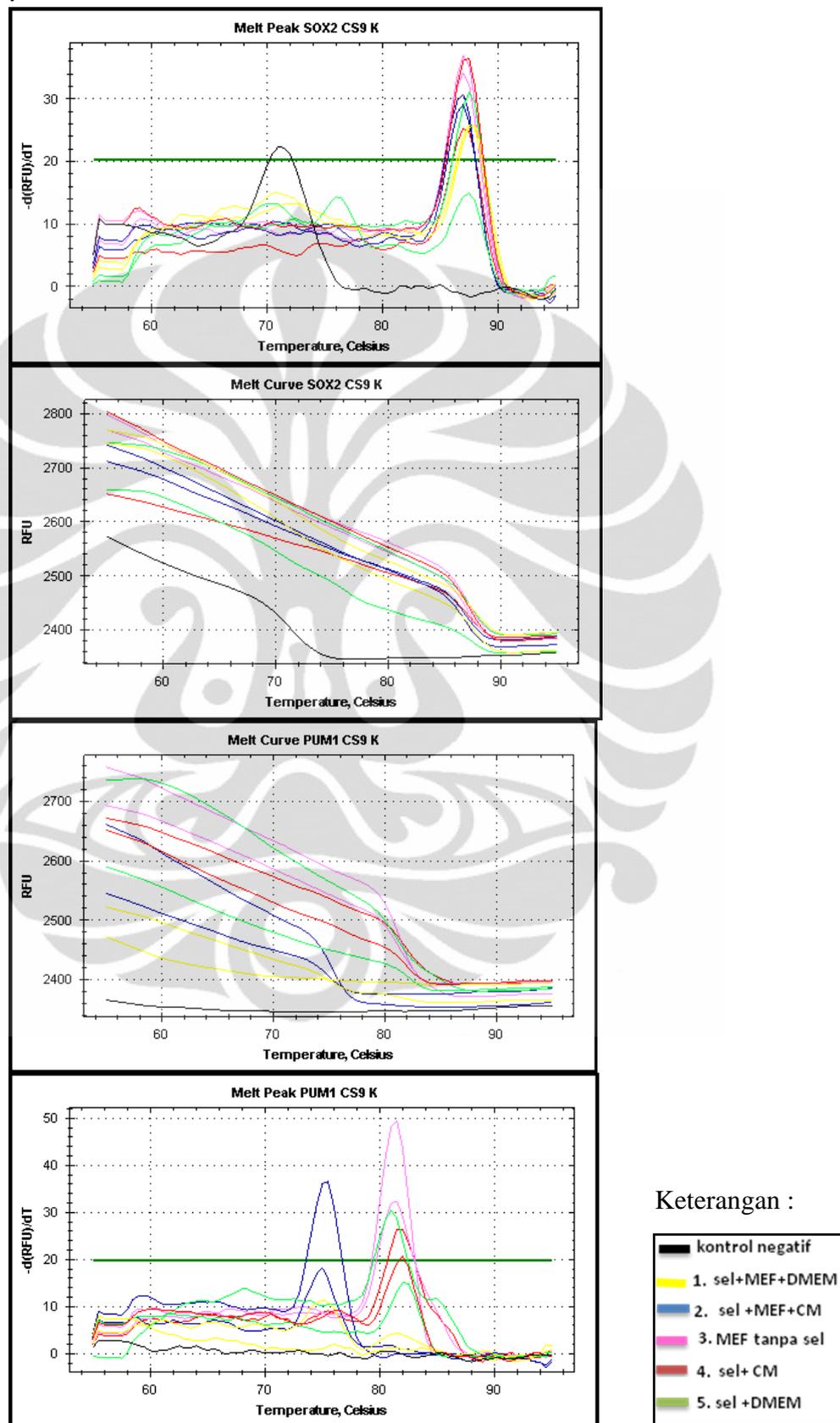
No	Nama Primer dan Komposisi Basa	Mulai	Berhenti
1	SOX2 F (NM_003106.3) 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3' SOX2 R 5'-CATGGAGTTGTACTGCAGG-3' Panjang amplikon 168	900 1067	917 1049
2	PUM1 F (NM_001020658.1) 5'-TGAGGTGTGCACCATGAAC-3' PUM1 R 5'-CAGAATGTGCTTGCCATAG G-3' Panjang amplikon 187	3416 3602	3434 3583

<p>Score = 36.2 bits (18), Expect = 4e-07 Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%) Strand=Plus/Plus Query 1 CAGCGCATGGACAGTTAC 18 Sbjct 900 CAGCGCATGGACAGTTAC 917</p>	<p>Score = 38.2 bits (19), Expect = 1e-07 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Minus Query 1 CATGGAGTTGTACTGCAGG 19 Sbjct 1067 CATGGAGTTGTACTGCAGG 1049</p>
<p>Score = 38.2 bits (19), Expect = 2e-07 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Plus Query 1 TGAGGTGTGCACCATGAAC 19 Sbjct 3416 TGAGGTGTGCACCATGAAC 3434</p>	<p>Score = 40.1 bits (20), Expect = 5e-08 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus Query 1 CAGAATGTGCTTGCCATAGG 20 Sbjct 3602 CAGAATGTGCTTGCCATAGG 3583</p>

<p>438 TG TACAACA TGA TGGAGACGGA GCTGAAAGCCG CCGGGCCCGC 481 AGCAAACCTTC GGGGGGCGGC GGGGGCAACT CCAAGCGGGC GGGGGCGGGC GGCAACCAGA 541 AAAACAGCCC GGACCGGCTC AAGGGGCCCA TGAATGCCIT CATGOTGTGG TCCCGCGGGC 601 AGCGGCGCAA GATGGCCCA GAGAACCCCA AGATGCCA CAA CTCGGAGATC AGCAAGCGCC 661 TGGGGCCGCGA GTGGAAACTT TTGTGGGAGA CGGAGAAAGC GCGCTTCATC GACGAGGCTA 721 AGCGGCTGGC AGCGCTGCAC ATGAAAGGAGC ACCCGGATTA TAAATACCGG CCCCGGCGGA 781 AAACCAAGAC GCTCATGAAG AAGGATAAGT ACACCGTCCC CGGCGGCGTG CTGGCCCGCG 841 CCGGCAATAG CATGGCGAGC GGGGTGGGG TGGGGCGGG CCGGGCGCG GGCGTGAACC AGCGCATGGA CACTTAC 901 AGCGCATGGA CAGTTACCGC CACATGAACG GCTGGAGCAA CGCGAGCTAC AGCATGATGC 961 AGCAGCACTG GGGTACCCG CAGCACCCGG GCTCAATGC GCA CGCGGCA CGGAGATGC GGACCTCATCTT GAGGTAC 1021 AGCCCATGCA CCGCTACGAC GTGAGGGCC TGCAGTACAA CTCCATGACC AGCTCGCAGA 1081 CCTACATGAA CCGCTCGCC AACTACAGCA TGTCTACTC GCAGCAGGGC ACCCCTGGCA 1141 TGGCTCTTGG CTCCATGGT TGGGTGG TCA AGTCCGAG GC CAGCTCCAGC CCCCCTGTGG 1201 TTAOCTCTTC CTCCACTCC AGGGGCGCCT GCCAGGCGGG GGACCTCCGG GACATGATCA 1261 GCATGTATCT CCGCGGGCGC GAGGTGCGGG AACCCGCGCG CCCCAGCAGA CTTCACATGT 1321 CCCAGCACTA CCGAGCGGC CCGGTGCCCC GCACGGCCAT TAAAGGCACA CTGCCCCCTC 1381 CACACATGTG A</p>	<p>2881 GGCCATGTCT TGAAGTGTGT GAAAGATCAG AATGGCAA TC ACCTGGTTCA GAAATGCATT 2941 GAATGTGTAC AGCCCAAGTC TTGCAATT ATCATCGATG CGTTTAAGGG ACAGGTATT 3001 GCCTTATCCA CACATCCTTA TGGTGGCGGA GTGATTGAGA GAATCCTGGA GCCTGTCTC 3061 CCGTACCAGA CACTCCCTAT TTTAGAGGAG CTTCACCA GC ACACAGAGCA GCTTGTACAG 3121 GATCAATATG GAAATTATGT AATCCAACT GACTCGAGC ACGGTCTCC TGAGGATAAA 3181 AGCAAAATG TAGCAGAAAT CCGAGGCAAT GACTCTGTAT TGAGTCAGCA CAAATTGCA 3241 AGCAATGTTG TGGAGAAGTG TGTACTCAC GCCTCACGTA CGGAGCGCGC TGTGTCTATC TGACCTGTGCACCATGAA C 3301 GATGAGGTGT GCACCATGAACGAAGGTCCC CACAGTCCCT TATACACCAT GATGAAAGGAC 3361 CAGTATCCA ACTACGTGGT CCAGAAAGATG ATTGACGTGG CCGAGCCAGG CCAGCGGAAG 3421 ATCGTCATGC ATAAGATCG CCCCCACATC GCAACTCTTC GTAAGTACA G GATACGGTTC C CTATGGCAAG GTGTAAGAC 3481 CACATTCTGG CCAAGCTGGA GAAGTACTAC ATGAAGAAGC GTGTTGACTT AGGGCCCA TC 3541 TGCATAAGAT CCGGCCCCAC ATCGCAACTC TTCGTAAGTA CACCTATGGC AAGCACATTC 3601 TGGCCAAAGCT GGAGAAGTAC TACATGAAGA ACGGTGTTGA CTTAGGGCCC ATCTGTGGCC 3661 CCCCATAATGG TATCATCTGA GGCAGTGTCA</p>
--	--

[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 12 Mei 2011]

Lampiran 8. Kurva melt kurve dan melt peak gen SOX2 dan PUM1



Lampiran 9. Gambar alat yang digunakan dalam penelitian.



Keterangan :

- a. *Real-time* PCR [Biorad,USA]
- b. Spektrofotometer NanoDrop ND2000 [Thermo Scientific, USA]
- c. UV transiluminator [Biorad, USA]
- d. Alat cetakan dan elektroforesis gel akrilamid Biorad,USA]
- e. [Mikroskop [Olympus,USA]
- f. Alat PCR [MJ Research, USA]
- g. Spektrofluoresens (Perkin Elmer, USA)

Lampiran 10. 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 11. Spesifikasi primer SOX2 dan PUM1

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'CAGGCGCATGGACAGTTAC3'
Oligo Number: 55004

Delivered:	13 OD 431 ug 78.24 nmol	No. Bases: 18 MW: 5509 Tm: 45.2	Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MALDI-TOF
Conc.:	782ul to 100 uM		

Oligo Name: Sox2mid-630R
5'CATGGAGTTGTACTGCAGG3'
Oligo Number: 55007

Delivered:	8 OD 276 ug 46.91 nmol	No. Bases: 19 MW: 5684 Tm: 46	Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MALDI-TOF
Conc.:	489ul to 100 uM		

Printed on: 8/12/2009 2:45:54 PM Page 2

1stBASE
 Your Research. Our business.

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

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

Oligonucleotide Datasheet for Ibu Wendrayani

SynthID	Oligo Name	Sequence	Mod	Len	Scale	Purity	Tm(°C)	GC(%)	MW	OD	ug	pmol	To make 100 uM
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	38776	add 388ul of dH2O
731133	PUM1R	5'-CAG AAT G TG CTT GCC ATA GG-3'		20	50 nmole	PCR Grade	60.4	50.0	6157	5.3	168.0	27291	add 273ul of dH2O

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

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 oligo is delivered in wet format, it will be in the concentration (e.g. 100uM) 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 12. 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	✓
Buffer RW1	29.02–33.75 (1/2 dilution)	7.30–7.70	✓
Buffer RPE	3.19–3.83	7.30–7.70	✓
RNase-free water	< 0.005	–	✓

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	✓
Kidney:	≥ 6 µg total RNA	✓
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ :	1.9 – 2.3 (at pH 7.5)	✓

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: *M. Indees* Date: 05/12/10
0905/1 (mm/dd/yy)
