



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI GEN SOX2 PADA SEL KANKER PAYUDARA
CD44+/CD24- DAN CD44-/CD24- YANG DI KO-KULTUR
DENGAN MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)**

SKRIPSI

RR. CHRYSNA WINANDHA K.

0706163426

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2011



UNIVERSITAS INDONESIA

**EKSPRESI GEN SOX2 PADA SEL KANKER PAYUDARA
CD44+/CD24- DAN CD44-/CD24- YANG DI KO-KULTUR
DENGAN MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)**

SKRIPSI

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

RR. CHRYSNA WINANDHA K.

0706163426

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FARMASI

DEPOK

JULI 2011

ii

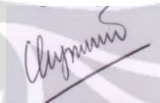
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Rr.Chryсна Winandha K.

NPM : 0706163426

Tanda tangan :



Tanggal : 4 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rr.Chryсна Winandha K.
NPM : 0706163426
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Ekspresi Gen SOX2 pada Sel Kanker Payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- yang di Ko-Kultur dengan MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

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.dr. Budiman Bela, Sp.MK

Pembimbing II : Dr. Amarila Malik, M.Si

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 : 4 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis 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.

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

1. Bapak dr. Budiman Bela, SpMK, selaku pembimbing I, yang telah memberikan waktu, tenaga dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si, 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. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga saya dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Dr. Silvia Surini, PhD selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan pikiran yang sangat bermanfaat selama penulis 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 Dody Kusuma dan Ibunda Arlina Dewi), kedua adikku (Indah dan Rama), Tante Gina dan Adit yang telah memberikan dukungan, doa, nasihat, kasih sayang dan semangat kepada penulis selama ini.
8. Semua sahabat seperjuangan Farmasi UI 2007 yang telah berjuang bersama penulis selama perkuliahan, rekan kerja dalam satu lembaga penelitian Liza, Noor, dan Kak Aulia yang telah banyak sekali membantu serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu per satu yang telah memberikan bantuan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Sahabatku Eka, Hary, Yayan, Edward, dan Mas Aji yang tak pernah lelah memberikan semangat kepada penulis. Terima kasih atas semua kasih sayang, dukungan, dan bantuan yang kalian berikan.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan semua pihak yang memerlukan.

Penulis

2011

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

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

Nama : Rr.Chryсна Winandha K.

NPM : 0706163426

Departemen : Farmasi

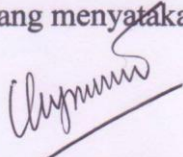
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Skripsi

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

Ekspresi Gen SOX2 pada Sel Kanker Payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- yang di Ko-Kultur dengan MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

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

Dibuat di: Depok
Pada tanggal: 4 Juli 2011
Yang menyatakan

(Rr.Chryсна Winandha K.)

ABSTRAK

Nama : Rr.Chryсна Winandha K.
Program studi : Farmasi
Judul : Ekspresi Gen SOX2 pada Sel Kanker Payudara CD44+/ CD24- dan CD44-/CD24- yang di Ko-Kultur dengan MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

Gen SOX2 telah dilaporkan memegang peranan penting dalam menginduksi sel punca progenitor dari sel fibroblast manusia dewasa. Peningkatan ekspresi gen SOX2 berkorelasi dengan peningkatan tingkat keparahan kanker payudara. Namun, bagaimana SOX2 memiliki sifat onkogenik belum diketahui secara pasti. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan informasi mengenai ekspresi gen SOX2 pada sel kanker payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- yang di ko-kultur dengan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) berdasarkan waktu pengkulturan sel sebagai upaya untuk mempelajari ekspresi gen dan sifat dari sel punca kanker payudara pada sel kanker payudara dari pasien kanker payudara wanita Indonesia. Tingginya ekspresi gen SOX2 diasumsikan dapat menjadi indikasi untuk menentukan kondisi optimum pada kultur sel kanker payudara. Level RNA gen SOX2 diukur dengan menggunakan *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) dan dinormalisasi dengan menggunakan *housekeeping gene* PUM1 sebagai kontrol dalam. Hasil menunjukkan bahwa ekspresi gen SOX2 tertinggi di hari ketiga pada kultur sel punca kanker (CD44+/CD24-), demikian pula dengan kultur sel non punca (CD44-/CD24-), dan di hari pertama pada kultur sel kanker payudara (CD44/CD24).

Kata kunci : kanker, sel punca, SOX2, PUM1, RT-PCR
xiv+91 halaman : 25 gambar; 7 tabel; 17 lampiran
Daftar Pustaka : 105 (1959 -2011)

ABSTRACT

Name : Rr.Chryсна Winandha K.
Program study : Pharmacy
Title : Gene Expression of SOX2 in Breast Cancer Cell CD44+/CD24- and CD44-/CD24- in Co-Culture with MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*)

SOX2 gene has been reported to play an important role in inducing stem cell progenitor cells from adult human fibroblasts. Increase in SOX2 gene expression known to correlate with the increase of breast cancer severity. However, the oncogenic properties of SOX2 has not been confirmed yet. This research aimed to obtain information about the level of SOX2 gene expression of breast cancer cells CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- in co-culture with *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) based on time of cell culture, in an attempt to study the gene expression and the nature of cancer stem cells in breast cancer cell in Indonesian female breast cancer patient. High SOX2 gene expression was assumed as the indication of the optimum culture condition of breast cancer cell. SOX2 gene RNA level was measured performing reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and normalized using the *housekeeping gene* PUM1 as an internal control. Results showed that the highest SOX2 gene expression was found in day 3 for cancer stem cell cultures (CD44+/CD24-) as well as for non cancer stem cell cultures (CD44-/CD24-), and in day 1 for breast cancer cell cultures (CD44/CD24).

Key Words : cancer, stem cell, SOX2, PUM1, RT-PCR
xiv+91 pages : 25 pictures; 7 tables; 17 appendices
Bibliography : 105 (1959 - 2011)

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN SAMPUL	i
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.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Kanker Payudara	5
2.2. Sel Punca.....	7
2.3. Sel Punca Kanker.....	8
2.4. Gen SOX2.....	10
2.5. <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> (MEF)	11
2.6. Penanda Permukaan Sel (<i>marker</i>) CD44 dan CD24	12
2.7. Ekstraksi RNA.....	13
2.8. <i>Sequencing</i>	14
2.9. Normalisasi mRNA	15
2.10. <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>	18
2.11. Elektroforesis Gel.....	20
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	21
3.2. Perijinan Komisi Etik	21
3.3. Bahan	21
3.4. Alat	22
3.5. Cara Kerja	24
3.5.1. Pembuatan Medium Kultur	24
3.5.2. Penggantian Medium.....	25
3.5.3. Pelaksanaan Kultur sel	25
3.5.4. Pemanenan Kultur Sel Kanker Payudara	26
3.5.5. Ekstraksi Total RNA	27
3.5.6. Analisis Kemurnian Total RNA	28
3.5.7. Optimasi RT-PCR.....	29

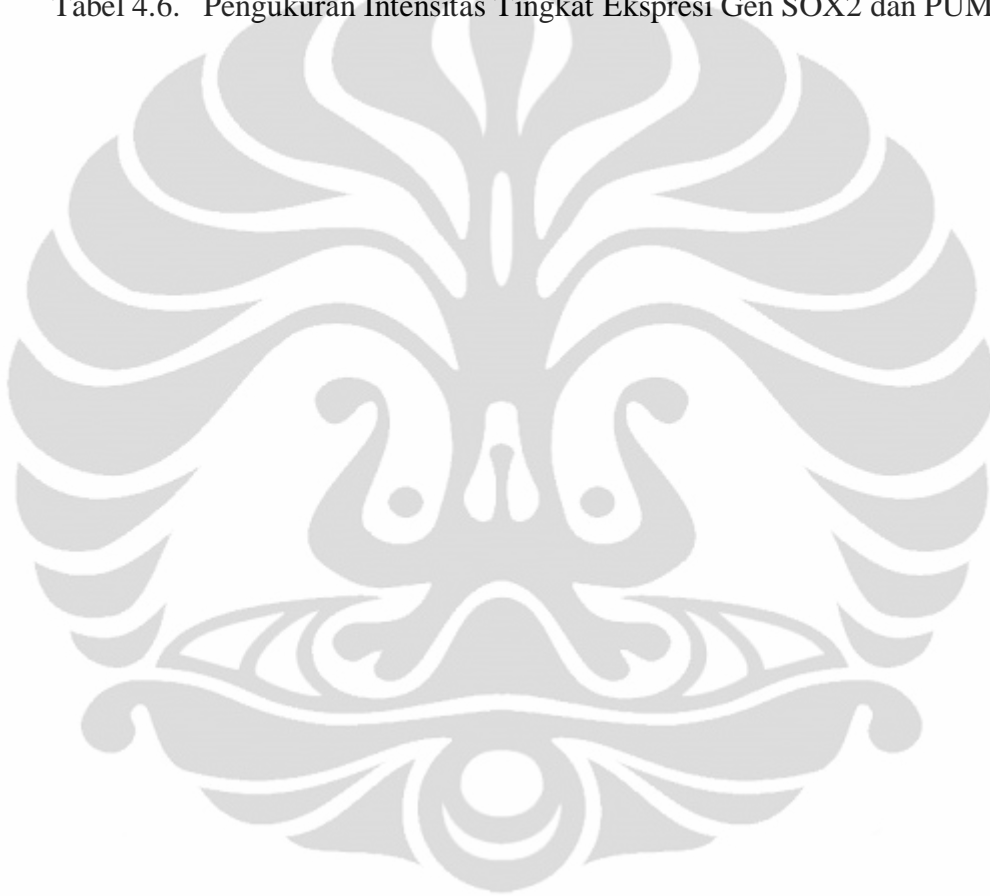
3.5.8. <i>Sequencing</i> dan Analisis Hasil Sekuen	30
3.5.9. Pengukuran RT-PCR.....	31
3.5.10. Uji Linearitas	32
3.5.11. Pengukuran Tingkat Ekspresi Gen SOX2	33
3.5.12. Analisis Amplikon dengan Elektroforesis Gel Akrimalid ..	33
3.5.13. Pengukuran Intensitas	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1. Pembuatan Medium Kultur	35
4.2. Penggantian Medium	35
4.3. Pelaksanaan Kultur Sel Kanker Payudara.....	36
4.4. Pemanenan Kultur Sel Kanker Payudara.....	37
4.5. Ekstraksi Total RNA	38
4.6. Analisis Kemurnian Total RNA	39
4.7. Optimasi RT-PCR	40
4.8. <i>Sequencing</i> dan Analisis Hasil Sekuen.....	43
4.9. Uji Linearitas RT-PCR	45
4.10. Analisis Tingkat Ekspresi Gen SOX2	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1. Kesimpulan	55
5.2. Saran	55
DAFTAR ACUAN	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1.	Anatomi Payudara Normal Manusia..... 5
Gambar 2.2.	Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia 10
Gambar 2.3.	Letak Gen PUM1 pada Kromosom Manusia..... 17
Gambar 2.4.	Proses RT-PCR..... 23
Gambar 3.1.	Skema Cara Kerja 34
Gambar 4.1.	Hasil Optimasi RT-PCR untuk SOX2 41
Gambar 4.2.	Hasil Optimasi RT-PCR untuk PUM1 42
Gambar 4.3.	Analisis Uji Linearitas SOX2 dan PUM1 46
Gambar 4.4.	Kurva Hasil Uji Linearitas SOX2 46
Gambar 4.5.	Kurva Hasil Uji Linearitas PUM1 47
Gambar 4.6.	Perbandingan Ekspresi mRNA SOX2 pada Gel Poliakrilamid 8% .. 48
Gambar 4.7.	Perbandingan Ekspresi mRNA PUM1 pada Gel Poliakrilamid 8% .. 49
Gambar 4.8.	Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar Gen SOX2 dan PUM1 pada Subpopulasi Sel CD44+/CD24- 50
Gambar 4.9.	Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar Gen SOX2 dan PUM1 pada Subpopulasi Sel CD44-/CD24- 50
Gambar 4.10.	Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar Gen SOX2 dan PUM1 pada Populasi Sel Kanker Payudara CD44/CD24..... 51
Gambar 4.11.	Kurva Hasil Normalisasi Gen SOX2 dan PUM1 pada Subpopulasi Sel CD44+/CD24-, CD44-/CD24-, dan Populasi Sel Kanker Payudara CD44/CD24 52
Gambar 4.12.	Pertumbuhan Sel Setelah Ditanam 65
Gambar 4.13.	Pertumbuhan Sel Hari Pertama 65
Gambar 4.14.	Pertumbuhan Sel Hari Ketiga..... 66
Gambar 4.15.	Pertumbuhan Sel Hari Ketujuh..... 66
Gambar 4.16.	Pertumbuhan Sel Hari Keempat belas..... 67
Gambar 4.17.	Hasil Purifikasi Produk PCR untuk <i>Sequencing</i> 67
Gambar 4.18.	Hasil Elektroferogram <i>Sequencing</i> Gen SOX2 F..... 68
Gambar 4.19.	Hasil Elektroferogram <i>Sequencing</i> Gen SOX2 R 69
Gambar 4.20.	Alat yang Digunakan dalam Penelitian 70

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 3.1. Urutan Basa Primer untuk RT-PCR.	71
Tabel 4.1. Hasil Perhitungan Jumlah Sel pada Setiap Perlakuan Hari.....	71
Tabel 4.2. Hasil Perhitungan Konsentrasi pada Setiap Perlakuan Hari	72
Tabel 4.3. Komposisi dan Perhitungan Larutan pada RT-PCR.....	73
Tabel 4.4. Pengukuran Intensitas Optimasi SOX2 dan PUM1.....	73
Tabel 4.5. Hasil Uji Linearitas SOX2 dan PUM1	74
Tabel 4.6. Pengukuran Intensitas Tingkat Ekspresi Gen SOX2 dan PUM1	74



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Skema proses sortir sel dengan MINIMACs <i>cells separator</i>	75
Lampiran 2. Posisi desain primer SOX2 pada susunan nukleotida manusia .	76
Lampiran 3. Posisi desain primer PUM1 pada susunan nukleotida manusia.	76
Lampiran 4. Pemeriksaan BLASTN SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida manusia.....	77
Lampiran 5. Posisi desain primer SOX2 pada susunan nukleotida mencit....	78
Lampiran 6. Posisi desain primer PUM1 pada susunan nukleotida mencit ...	78
Lampiran 7. Pemeriksaan BLASTN SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida mencit.....	79
Lampiran 8. Hasil analisis BLASTN sekuen SOX2.....	80
Lampiran 9. Hasil <i>alignment</i> sekuen SOX2.....	81
Lampiran 10. Cara pembuatan reagen dan dapar	82
Lampiran 11. Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>).....	84
Lampiran 12. Komposisi DMEM/F12	85
Lampiran 13. Surat persetujuan komisi etik.....	87
Lampiran 14. Spesifikasi primer SOX2.....	88
Lampiran 15. Spesifikasi primer PUM1	89
Lampiran 16. Sertifikasi analisis <i>RNeasy Mini Kit</i>	90
Lampiran 17. Sertifikasi analisis <i>Qiagen OneStep</i> RT-PCR.....	91

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kanker payudara adalah jenis kanker yang berkembang pada jaringan sekitar payudara yang menyerang sel-sel tertentu dengan frekuensi kejadian yang tinggi dan merupakan penyebab kematian kedua kanker pada wanita di dunia (Jemal et al., 2002; Chan dan Morris, 2006). Awalnya kanker payudara tidak menimbulkan gejala. Gejala yang paling umum, biasanya berupa benjolan yang terasa jelas berbeda dari jaringan payudara disekitarnya (Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy, 2008).

Kanker payudara paling sering dialami wanita di Indonesia, setelah kanker mulut rahim. Namun pada tahun 2005 hingga kini kanker payudara menempati posisi pertama pada kasus kanker di Indonesia (Depkes RI, 2007). Setiap tahun ada 100 wanita dari 100.000 penduduk Indonesia yang terkena kanker payudara (Djoerban, 2011). Berdasarkan data dari *Globe Burden of Cancer*, IARC 2002, diperoleh estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia berkisar 26 per 100.000 perempuan (Ferlay, 2002). Selain itu, menurut data Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kejadian kanker payudara di Indonesia sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen sedangkan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2010).

Telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengobati kanker payudara. Namun, hasil pengobatan kanker payudara hingga saat ini belum memuaskan. Diperkirakan 50% penderita dapat disembuhkan apabila pasien segera tanggap dan melakukan pemeriksaan pada stadium dini. Penyebab kanker payudara belum diketahui secara pasti, namun diduga terjadi akibat kerusakan pada gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Selain itu, faktor imun tubuh seseorang juga sangat mempengaruhi terjadinya kanker. Sebelum sel berubah menjadi ganas ada mekanisme pertahanan diri atau perbaikan diri pada sel untuk menekan terjadinya kanker. Apabila laju penekanan ini tidak berfungsi dengan baik maka akan timbul keganasan pada sel (Haryana dan Soesatyo, 1995; Sudiana, 2008).

Kebijakan klinis terapi konvensional pada kanker, umumnya berdasarkan anggapan bahwa semua sel kanker mempunyai potensi keganasan yang sama, tanpa mempertimbangkan adanya sel punca kanker. Pengobatan kanker berhasil mengangkat sekumpulan sel kanker namun gagal untuk mengeliminasi sel punca kanker. Baru sejak 7 tahun yang lalu diketahui keberadaan sel kanker payudara bersifat tumorigenik dan diidentifikasi sebagai sel punca kanker (Al Hajj et al., 2003; Song dan Miele, 2007). Berbagai penelitian dikembangkan untuk mencari cara yang lebih efektif dan spesifik dalam pengobatan kanker dengan memanfaatkan sifat reseptor permukaan sel kanker payudara sehingga dapat ditemukan pengobatan berbasis molekuler yang tertuju hanya pada kanker payudara tanpa mengganggu sel-sel normal lainnya (Dick, 2003).

Fillmore dan Kupperwasser (2007) dalam studinya menyatakan bahwa sel punca kanker payudara manusia bersifat heterogen. Hal ini berdasarkan identifikasi beberapa penanda permukaan sel, yaitu CD44+, CD24-/low, ESA+, dan CD133+ pada populasi sel punca kanker payudara yang berbeda. Studi lain dilakukan oleh Al-Hajj (2003) dengan melakukan identifikasi molekul permukaan sel payudara pada hewan coba. Pada pemeriksaan, dilakukan penginduksian tikus dengan agen karsinogenik dan diperoleh adanya CD44 positif (CD44+) dan CD24 negatif/sedikit (CD24-/low).

Selain itu, terdapat informasi mengenai adanya ekspresi gen SOX2, OCT3/4, *Klf4*, dan *c-Myc* yang dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel-sel yang telah terdiferensiasi seperti fibroblast, atau disebut dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Informasi tingkat ekspresi maupun polimorfisme dari keempat gen tersebut pada sel kanker payudara menarik untuk diteliti. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, diperoleh tingkat ekspresi gen SOX2 dan *c-Myc* meningkat sebanyak 1,47% - 13,11% dan 27,37% - 37,77% pada sel kanker payudara dibandingkan dengan sel normal payudara (Ornela, 2010). Ekspresi dari gen SOX2 terdeteksi pada sel kanker payudara dan memiliki kemampuan dalam meningkatkan proliferasi dan tumorigenik kanker payudara (Soignier, 2011).

Untuk mempelajari ekspresi gen tersebut dan sifat dari sel punca kanker pada sel kanker payudara, perlu dilakukan upaya untuk mempertahankan sifat

Universitas Indonesia

pluripotensi sel punca kanker. Kemampuan sel punca kanker berdiferensiasi dapat menyebabkan peneliti seringkali gagal dalam mempelajari sifat-sifat sel punca kanker. Hal ini karena sifat pluripotensi sel dapat hilang selama proses kultur dan penyimpanan. Kultur sel dengan menggunakan media dengan kondisi kultur khusus diharapkan dapat mempertahankan sifat pluripotensi dari sel sehingga sel tidak terdiferensiasi (Jung et al., 2004).

Mouse Embryonic Fibroblas (MEF) sebagai *feeder layer* pertumbuhan sel diketahui dapat mempertahankan sifat pluripotensi dari sel punca embrio pada manusia (Jung et al., 2004). Penggunaan MEF sebagai *feeder layer* pada kultur sel punca kanker payudara diharapkan mampu mencegah diferensiasi sel, sehingga mampu mempertahankan sifat pluripotensi sel punca kanker. Pada penelitian ini, akan digunakan sel kanker payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- untuk memperoleh informasi mengenai ekspresi gen SOX2 berdasarkan waktu pengkulturan sel.

Ko-kultur sel kanker payudara dengan MEF dilakukan dengan menggunakan medium DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) dan dipanen pada hari ke-1, ke-3, ke-7, dan ke-14. Pengukuran jumlah sel punca yang mengekspresikan tingkat gen SOX2 pada sel punca kanker digunakan sebagai parameter dalam menilai ketahanan sifat pluripotensi dari sel punca kanker payudara.

Pengukuran tingkat ekspresi gen SOX2 di dalam penelitian dilakukan dengan metode molekular semi-kuantitatif *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dengan menggunakan cetakan total RNA dan primer spesifik untuk gen target SOX2 dan *housekeeping genes* PUM1 sebagai kontrol dalam. Pengukuran tingkat ekspresi dilakukan dengan mengukur intensitas pita gen target dengan menggunakan densitometri dan hasil pengukuran dinormalisasi dengan intensitas pita *housekeeping genes* PUM1.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi mengenai ekspresi gen SOX2 pada sel kanker payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- yang di ko-kultur dengan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) berdasarkan waktu pengkulturan sel.

1.3. Manfaat Penelitian

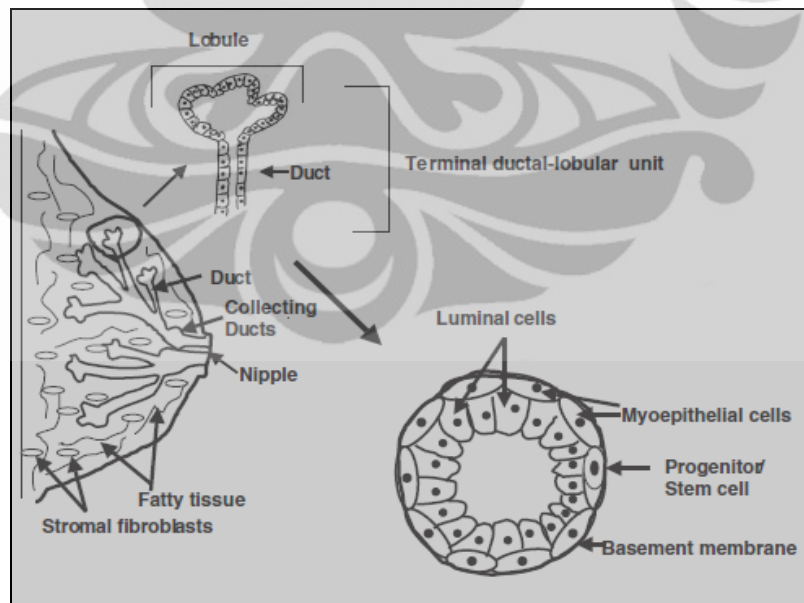
Informasi mengenai yang ekspresi gen SOX2 pada sel kanker payudara CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- yang di ko-kultur dengan *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) yang mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara berdasarkan tingkat ekspresi SOX2 yang tinggi, dapat digunakan untuk memperbanyak sel punca kanker payudara dalam rangka studi pengembangan terapi kanker payudara.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kanker Payudara

Payudara terdiri dari kelenjar penghasil susu (lobulus), lemak, dan jaringan berserat yang melekat pada dinding dada dengan alur berserat disebut *ligamen cooper*. Payudara berisi 15-20 lobus yang diselubungi dan didukung oleh jaringan ikat atau lemak. Setiap lobus mengandung lobulus, terdiri dari kelenjar alveoli yang menghasilkan susu pada proses laktasi. Lobulus tersusun dari sekumpulan kelenjar pensekresi susu, yang disebut alveoli dan melekat pada jaringan penghubung. Ketika susu diproduksi, susu keluar dari alveoli menuju puting melalui saluran payudara yang berkembang membentuk *lactiferous sinuses* dan merupakan tempat dimana susu disimpan sebelum dikeluarkan melalui *lactiferous duct* (Kopans, 2007). Kelenjar susu juga didukung oleh jaringan interstisial, intralobular adiposa dan jaringan ikat, terutama terdiri dari fibroblas, sel endotel, sel darah, dan sel saraf (Saxena dan Rangarajan, 2008).



Gambar 2.1. Struktur Payudara Normal Manusia

[Sumber: Dimri, Band, dan Band, 2005]

Kanker payudara paling sering dialami wanita di Indonesia, setelah kanker mulut rahim. Di Indonesia, setiap tahun ada 100 wanita dari 100.000 penduduk yang terkena kanker payudara (Djoerban, 2011). Namun pada tahun 2005 hingga kini kanker payudara menempati posisi pertama pada kasus kanker di Indonesia (Depkes RI, 2007). Berdasarkan data dari *Globe Burden of Cancer*, IARC 2002, diperoleh estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia berkisar 26 per 100.000 perempuan (Ferlay, 2002). Selain itu, berdasarkan data Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kejadian kanker payudara di Indonesia sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2011).

Penyebab kanker payudara belum diketahui secara pasti, namun diduga terjadi akibat kerusakan pada gen yang mengatur pertumbuhan dan diferensiasi sel. Selain itu, faktor imun tubuh seseorang juga sangat mempengaruhi terjadinya kanker. Sebelum sel berubah menjadi ganas ada mekanisme pertahanan diri atau perbaikan diri pada sel untuk menekan terjadinya kanker. Apabila laju penekanan ini tidak berfungsi dengan baik maka akan timbul keganasan pada sel (Haryana dan Soesatyo, 1995; Sudiana, 2008). Ada beberapa faktor resiko terjadinya kanker payudara, diantaranya usia, keturunan, riwayat tumor jinak payudara, peningkatan hormon estrogen (penggunaan kontrasepsi oral), kehamilan pertama setelah usia 30 tahun, diet dan gaya hidup (obesitas, konsumsi alkohol), paparan radiasi, perubahan pada payudara yang dianggap tidak berbahaya, dan menopause lambat. Studi analitik faktor resiko pada kanker payudara menunjukkan adanya peningkatan resiko hingga 50% pada wanita yang tidak memiliki anak (*nullipara*) (Trichopoulos et al., 1997; Hukom, 2003).

Pengobatan kanker payudara dilakukan bergantung pada tahap dan jenis kanker payudara. Pengobatan dapat berupa pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi radiasi. Biasanya digunakan satu atau lebih macam pengobatan untuk mendapatkan hasil yang lebih maksimal. Sampai saat ini, mammografi merupakan pemeriksaan yang utama digunakan untuk skrining kanker payudara. Dalam stadium awal, kanker secara umum dan khususnya payudara, memberikan hasil pengobatan yang lebih baik dibandingkan stadium lanjut. Berbagai kriteria telah ditetapkan sehingga pengobatan kanker payudara

Universitas Indonesia

dini dapat memberikan hasil yang optimal serta menurunkan komplikasi akibat berbagai tindakan medis yang harus dijalani (Kardinah, 2003).

2.2. Sel Punca

Sel punca adalah sel tunggal yang dapat bereplikasi untuk memperbanyak diri dan berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Pada banyak jaringan, sel ini berperan sebagai sistem perbaikan internal yaitu dengan membelah dan menggantikan sel yang rusak atau mati selama organisme tersebut masih hidup (Siminovith, McCulloch, dan Till, 1963). Sel punca juga memiliki kemampuan untuk memperbaharui atau meregenerasi dirinya sendiri (*self-renewal*), yaitu dapat membuat salinan sel yang persis sama dengan dirinya melalui pembelahan sel (Reye et al., 2001).

Sel-sel ini merupakan kumpulan sel yang dapat ditemukan pada semua tahap perkembangan dari mulai embrio masa *pre-implantasi* sampai dengan masa dewasa. Terdapat dua kelompok sel punca menurut sumbernya yaitu *Embryonic Stem Cell* (ESC) dan *Adult Stem Cell* (ASC). ASC yang diisolasi dari berbagai jaringan tubuh telah menjadi alternatif pilihan sebagai sumber sel punca karena sifatnya yang fleksibel dan dapat menghasilkan beragam varietas tipe sel sehingga dapat diaplikasikan dalam terapi berbasis sel (The National Academies, 2010).

Adult Stem Cell (ASC) dapat diambil dari berbagai macam sumber, antara lain darah tali pusat, sumsum tulang, darah tepi, dan jaringan lemak. ASC banyak ditemukan di jaringan, termasuk pada pembuluh darah, penghubung otak dan tulang belakang, otot rangka, kulit, hati, pankreas, sistem pencernaan, kornea serta retina. ASC tidak kalah pentingnya dibanding sel punca embrionik karena jumlah dan fungsinya yang juga sangat memadai dan potensial untuk terapi berbagai penyakit (Gardner, 2007; Walsh, 2007). Sel punca juga diaktifkan selama proses pembentukan jaringan akibat pengaruh hormon, khususnya selama masa pubertas (Dean, 2008).

Sel punca sangat berperan dalam perkembangan penelitian di bidang kedokteran, diantaranya dapat digunakan untuk:

- a. Terapi gen, yaitu sebagai alat pembawa transgen ke dalam tubuh pasien, dan selanjutnya dapat dilacak apakah berhasil mengekspresikan gen tertentu dalam tubuh pasien
- b. Mengetahui proses biologis, yaitu perkembangan organisme dan perkembangan kanker. Melalui sel punca dapat dipelajari nasib sel, baik sel normal maupun sel kanker
- c. Penemuan dan pengembangan obat baru, yaitu untuk mengetahui efek obat terhadap berbagai jaringan
- d. Terapi sel berupa *replacement therapy* karena sel punca dapat hidup di luar organ tubuh manusia misalnya di cawan petri, maka dapat dilakukan manipulasi tanpa mengganggu organ tubuh manusia dan dapat ditransplantasi kembali masuk ke dalam organ tubuh untuk menangani penyakit-penyakit tertentu (Saputra, 2006).

Oleh karena itu, sel punca memegang peranan yang sangat penting dalam *cell-based therapy* karena sel ini dapat diperoleh dari pasien itu sendiri, mempunyai kapasitas proliferasi yang besar sehingga dapat diperoleh sel dalam jumlah besar dari sumber yang terbatas, mudah dimanipulasi untuk mengganti gen yang sudah tidak berfungsi lagi melalui metode transfer gen serta dapat bermigrasi ke jaringan target, berintegrasi ke dalam jaringan dan berinteraksi dengan jaringan tersebut (Saputra, 2006).

2.3. Sel Punca Kanker

Sel punca kanker adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor. Karakter *self renewal* yang dimiliki oleh sel punca kanker berbeda pada sel punca normal dimana sel punca normal akan berhenti membelah jika jumlah sel yang diinginkan sudah tercapai sedangkan pada sel punca kanker, sistem ini mengalami disregulasi dalam menginhibisi pembelahannya sehingga jumlah sel dalam jaringan kanker akan meningkat sehingga dikatakan bahwa sel punca kanker memiliki *indefinite proliferative potential* (Mei dan Rosen, 2006). Sel kanker mengalami mutasi yang hebat dan mengaktifasi *survival pathway* yang

Universitas Indonesia

dimilikinya, sehingga sel hasil mutasi berubah menjadi sel kanker yang *immortal*, dimana fenomena ini dikenal dengan sebutan ‘*regulation of the self-renewal*’ (Al-Hajj et al., 2003). Sel punca kanker jauh lebih resisten dari sel kanker biasa. Sel punca kanker memiliki gen antiapoptosis dan gen *multi drugs resistant*. Pemaparan obat antikanker hanya dapat mematikan sel kanker *mature*, sedangkan sel punca didalamnya akan tetap hidup atau berada dalam keadaan *dormant* hingga saat yang tepat untuk mereka dapat aktif kembali. Oleh karena itu, pengobatan dengan kemoradioterapi seringkali gagal dalam mencegah penyebaran tumor ke organ lain (Faried, 2006).

Peningkatan sel punca kanker yang menyebabkan terjadinya kanker dapat dipicu oleh beberapa hal berikut, diantaranya terjadi transformasi sel punca pada jaringan yang menyebabkan perubahan pertumbuhan dan diferensiasi sel, terjadinya transformasi mutasi sel progenitor, diferensiasi sel somatik pada jaringan *immortal*, penggabungan sel punca dengan sel punca yang telah berdiferensiasi yang menyebabkan peningkatan kemampuan *self-renewal*. (Bapat et al., 2008).

Salah satu metode untuk menganalisa sel kanker payudara yaitu mengisolasi sel dengan meningkatkan potensi tumor menggunakan *enzymatic assay* untuk mengukur aktivitas dari *aldehyd dehydrogenase 1* (ALDH1) dan hasilnya positif mengandung CD44+/CD24- (Herschkowitz, 2010). Pada penderita kanker payudara yang menjalani kemoterapi menunjukkan ekspresi dari CD44+/CD24- yang meningkat pada tumor dibandingkan pada populasi sel lainnya (Li et al., 2008). Studi lain menyatakan bahwa sel punca kanker pada kanker payudara herediter (ditandai dengan BRCA1) bersifat heterogen, karena kemungkinan besar berasal dari sel-sel yang berbeda, misalnya mengandung sel punca CD44+/CD24- dan sel punca CD133+ (Wright et al., 2008). Walaupun kedua populasi sel punca tersebut asalnya berbeda, namun keduanya memiliki gen-gen “*stemness*” yang umum, seperti Oct3/4, Notch1, ALDH1, *Fgfr1* dan Sox1 (Ginestier, 2007).

Ekspresi gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc diketahui dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel-sel yang telah terdiferensiasi (Takahashi, 2007). Namun pada umumnya publikasi yang melaporkan tingkat

Universitas Indonesia

ekspresi maupun polimorfisme gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc masih sangat terbatas. Semua upaya dalam memahami sel punca kanker adalah untuk mencari terapi andalan menggunakan prinsip dasar sel punca. Sasaran utama pengobatan pada penyakit kanker adalah menghancurkan sel punca kanker payudaranya. Jika sel punca kanker payudara telah dihancurkan maka pertumbuhan sel atau proliferasi diharapkan akan menjadi normal kembali. Selain itu, dapat memperbaiki gen-gen yang terdapat didalam sel kanker (Gil et al., 2008).

2.4. Gen SOX2

SRY (sex determining region Y)-box 2 atau yang dikenal sebagai SOX2 merupakan gen tanpa intron yang terletak dalam sebuah intron dari gen yang disebut SOX2 overlapping *transcript* (SOX2OT). Gen SOX2 berada pada kromosom manusia 3q26.3-q27. Gen SOX2 terletak lengan kromosom yang lebih panjang pada posisi antara 26.3 and 27 (Gambar 2.2) menghasilkan produk SRY (wilayah penentuan kromosom Y)-box 2, yang terdiri 317 asam amino panjang (34,3 kDa), merupakan domain grup mobilitas tinggi (*High Mobility Genes-HMG*) yang berisi transkripsi faktor totipotent dan mengontrol status pluripoten sel (Rodda, 2005). Gen ini banyak ditemukan pada banyak hewan dan memainkan peran penting dalam sel punca, organogenesis dan pertumbuhan (Wegner, 1999; Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657, 8 April 2010]

Gambar 2.2. Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia.

Kompleks SOX2-OCT4 merupakan komponen utama dalam mengatur jaringan genetik pluripoten (Rodda, 2005). SOX2 bersama OCT4 bekerja pada tahap awal embriogenesis, tepatnya pada awal stadium morula. Faktor-faktor ini ditemukan di *inner cell mass* (ICM) di sel blastosit pada embrio pre-implantasi.

Universitas Indonesia

Ekspresi dari kedua faktor terlihat dalam epiblast, jaringan yang berdiferensiasi menjadi embrio, dan sel-sel germinal setelah blastosit berimplantasi. Pentingnya SOX2 dan OCT4 sebagai regulator yang bertanggung jawab terhadap pluripotensi sel bersama dengan c-Myc dan Klf4 atau Nanog dan LIN28 dapat mempengaruhi diferensiasi dari sel somatik menjadi *induced Pluripotency Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Menurunnya ekspresi dari SOX2 dapat mengganggu sifat *self-renewal* dan pluripotensi dari *embryonic stem cells* (sel punca embrio) karena SOX2 mengontrol ekspresi dari susunan gen pada embrio (Kopp et al., 2008).

Belum diketahui secara pasti bagaimana gen SOX2 memiliki sifat onkogenik. Pada suatu studi yang dilakukan oleh Chen, et al (2008) dengan mempelajari 56 sampel sel kanker payudara dan 19 sampel sel payudara normal, diketahui bahwa peningkatan ekspresi gen SOX2 berkorelasi dengan peningkatan tingkat keparahan kanker payudara yaitu ditemukan pada 3 dari 9 sampel (33,3%) duktal karsinoma in situ, 11 dari 26 (42,3%) kanker stadium II dan 12 dari 21 (57,1%) kanker stadium III. Pada studi in vitro yang dilakukan oleh Dong dan rekannya (2004) menunjukkan gen SOX mampu merangsang transformasi onkogenik sel fibroblast.

Overekspresi dan/atau amplifikasi gen SOX berhubungan dengan sejumlah besar jenis tumor in vivo. Studi lain menyatakan bahwa terdapat hubungan faktor transkripsi SOX2 dan kanker pada manusia. SOX2 ditemukan sebagai antigen immunogenik pada 41% kanker paru-paru (Gure et al., 2006) dan 29% pasien meningioma (Comtesse et al., 2005). Ekspresi SOX2 berlebihan juga ditemukan pada 43% *basal cell-like breast carcinoma* (Rodriguez et al., 2007). Ekspresi dari gen ini terdeteksi pada sel kanker payudara dan memiliki kemampuan dalam meningkatkan proliferasi dan tumorigenik kanker payudara. Regulasi SOX2 meningkat pada *cell lines* kanker payudara dan terdeteksi pada semua *cell lines* kanker payudara (Soignier, 2011).

2.5. Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)

Mouse Embryonic Fibroblast sudah pernah digunakan sebelumnya sebagai *feeder cell* untuk mendukung pertumbuhan dari *human embryonic stem cells* (hESCs) (Jung et al., 2004). *Feeder layer* yang telah digunakan oleh para peneliti

Universitas Indonesia

adalah *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEF), *mouse macrophage*, *mouse thymocytes* dan *Human Embryonic Fibroblasts*. *Feeder layer* mengontrol diferensiasi dengan cara mempengaruhi lingkungan sel yaitu dengan mensekresikan metabolit yang dibutuhkan oleh sel punca, menyediakan tempat sel untuk melekat dengan sel lain dan mempengaruhi interaksi sel dengan *extracellular matrix* (ECM) serta mengkondisikan medium. Metabolit yang disekresikan oleh *feeder layer* adalah *growth factor* dan *cytokines* yang berperan penting dalam mempertahankan pluripotensi sel punca dengan menghambat diferensiasi sel (Nagaoka, 2008).

Penggunaan (MEF) sebagai *feeder layer* memungkinkan sel memiliki kemampuan untuk tumbuh pada kondisi tidak adanya serum. *Growth factor* (GF) yang dihasilkan oleh MEF diperlukan untuk mempertahankan pluripotensi dari sel sehingga sel tidak terdiferensiasi (Amit et al., 2003; Jung et al., 2004). Suatu studi yang dilakukan oleh Thomson, et al (1998) melaporkan bahwa *inner cell masses* (ICMs) pada blastosit berproliferasi secara terus menerus pada *feeder layer* MEF. Sel ini menunjukkan karakteristik yang spesifik yaitu tidak terbatasnya proliferasi tanpa terdiferensiasi, terekspresinya marker yang spesifik, tingginya peningkatan aktivitas telomerase serta pembentukan teratoma.

Suatu studi lain dilakukan oleh Yan, et al (2008) bertujuan untuk menemukan molekul kecil yang dapat menggantikan viral transduksi spesifik untuk memperoleh iPS (*induced Pluripotent Stem Cell*) dari sel. Adanya faktor transkripsi (*transcription factor*) dianggap penting untuk ekspresi Oct4, SOX2, dan Klf4. Pada penelitian tersebut digunakan MEF untuk dapat menginduksi faktor transkripsi sehingga proses yang terlibat dapat diidentifikasi.

2.6. Penanda Permukaan Sel (*marker*) CD44 dan CD24

Sel tubuh dapat mengekspresikan protein yang tidak dikenal pada permukaan sel bila sel tersebut mengalami kerusakan atau mengalami gangguan perkembangannya (Bellanti, 1993). Penelitian yang dilakukan oleh Al-Hajj dan rekan-rekannya pada tahun 2003, menginjeksikan *human breast cancer initiating cell* ke dalam lapisan lemak payudara dari *nonobese diabetic/severe combined*

immunodeficient (NOD/SCID), sehingga muncul antigen spesifik yaitu CD44, CD24, B38.1 dan epitel spesifik antigen ESA (Al-Hajj et al., 2003).

Sel kanker payudara mulai diidentifikasi pada karsinoma payudara sebagai CD44+/CD24-/low (ekspresi CD 44 tinggi dan CD 24 tidak atau sedikit) yang secara eksklusif mempertahankan aktivitas tumorigenik (Ponti, 2005). Ekspresi berlebihan dari molekul ini dapat menunjukkan keganasan dan kemampuan metastasis sel kanker. Pada percobaan yang dilakukan dengan menggunakan tikus, menunjukkan peningkatan ekspresi CD44 pada pembentukan tumor non-metastasis. Molekul CD44 merupakan glikoprotein transmembran yang mengandung banyak residu fosforin dan beberapa ikatan disulfida. Molekul glikoprotein ini berguna untuk mengubah inti protein dari 37-kDa. Gen CD44 manusia terletak pada lengan pendek kromosom 11p13 dan 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. (Azamris et al., 2003; Bolodeoku, n.d.).

Sedangkan molekul CD24 adalah suatu glikoprotein, *glycophosphatidil-inositol* (GPI). CD24 akan diekspresikan secara berlebihan pada keadaan *hematological malignancies* dan pada tumor padat seperti gastrik, renal, nasofaring, hepatoseluler, kolon dan kanker paru-paru. Molekul ini diekspresikan pada sel hematopoietik dan sel non-hematopoietik dan diekspresikan pada saat regenerasi jaringan (Motari et al., 2009). Pada penelitian yang dilakukan oleh Al-Hajj (2003) menunjukkan bahwa CD24-/low (tidak atau sedikit) diekspresikan pada kanker payudara.

2.7. Ekstraksi Total RNA

RNA khususnya mRNA dapat dijadikan gambaran ekspresi suatu gen karena jumlahnya dapat berubah-ubah sesuai kondisi lingkungan dibandingkan dengan DNA yang jumlahnya relatif stabil. RNA yang merupakan makromolekul biologis yang memiliki sejumlah fungsi yang berbeda. *Messenger RNA* (mRNA) yang ditranskripsi dari DNA berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis protein. Sintesis protein yang dilakukan oleh ribosom, terdiri dari RNA ribosomal (rRNA)

Universitas Indonesia

dan protein. Asam amino untuk sintesis protein dikirim ke ribosom oleh RNA transfer (tRNA) molekul. 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. (Alberts et al., 2008).

Konsentrasi RNA dapat dihitung dengan spektrofotometri. Spektrofotometri berfungsi untuk menghitung spektrum cahaya yang berasal dari objek tertentu dan merupakan instrumen untuk mengukur absorpsi atau penyerapan cahaya dengan energi (panjang gelombang) tertentu oleh suatu atom atau molekul. Spektrofotometer dapat menguraikan cahaya putih menjadi spektrum warna dengan panjang gelombang tertentu. Pengukuran konsentrasi suatu zat terlarut di dalam larutan dapat dilakukan dengan penyinaran secara langsung menggunakan spektrum cahaya spesifik dengan panjang gelombang tertentu (Vodopich dan Moore, 2005).

Spektrofotometer dapat digunakan untuk mengukur energi yang ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometri dapat juga digunakan untuk mengetahui kemurnian larutan asam nukleat. Teknik tersebut melibatkan absorbansi larutan pada dua panjang gelombang, yaitu 260 nm dan 280 nm, serta penghitungan rasio dari absorbansi tersebut adalah:

1. Nilai $A_{260}/A_{280} = 2,0$ merupakan karakteristik dari RNA murni
2. Nilai $A_{260}/A_{280} = 1,8$ merupakan karakteristik dari DNA murni
3. Nilai $A_{260}/A_{280} = 0,6$ merupakan karakteristik dari protein murni

Berdasarkan ketentuan tersebut maka kisaran untuk kemurnian asam nukleat adalah 1,8-2,0. Nilai kemurnian yang kurang dari 1,7 menunjukkan kemungkinan terdapat zat pengotor dalam larutan (Seidman dan Mowery, 2006).

2.8. *Sequencing*

Sequencing merupakan proses pembacaan urutan basa nukleotida dari DNA. Proses *sequencing* dapat dilakukan pada DNA genomik, cDNA, plasmid, dan gen hasil klonasi (Talaro dan Talaro, 2002). Metode yang digunakan untuk melakukan *sequencing* terdapat dua jenis, yaitu metode degradasi kimia

(dikembangkan oleh Maxam dan Gilbert) dan *metode chain termination* (dikembangkan oleh Sanger) (Brown, 2006).

Metode Maxam-Gilbert atau metode degradasi kimia dilakukan dengan menandai ujung 5' fragmen DNA melalui penempelan enzimatik radioaktif fosfat (^{32}P), kemudian diberikan reagen yang akan memodifikasi dan merusak ikatan DNA pada keberadaan titik tempat basa tertentu (Wolfe, 1995). *Sequencing* dengan metode Sanger atau metode *chain termination* diawali dengan melakukan sintesis pada untai DNA yang komplementer terhadap DNA yang akan di-*sequencing*. Metode tersebut menggunakan dideoksiribonukleotidtrifosfat (ddNTP) yang tidak memiliki gugus OH pada ujung 3' sehingga menghentikan pemanjangan rantai DNA oleh DNA polimerase (Wong, 2006).

Sequencing dengan metode *chain termination* telah diotomatisasi sehingga dikenal dengan metode *automated DNA sequencing*. Metode *automated DNA sequencing* menggunakan pewarna fluoresens yang menggantikan radioaktif fosfat pada metode *chain termination*. Pewarna fluoresens digunakan untuk memberi label pada ddNTP. Sinyal fluoresens dideteksi dengan menggunakan komputer sehingga pembacaan sekuen DNA dapat dilakukan (Brown, 2006). Sekuen DNA yang diperoleh melalui proses *sequencing* selanjutnya dapat ditentukan tingkat similaritasnya dengan sekuen DNA database pada GenBank melalui program BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide*) (Ausubel et al., 2003).

2.9. Normalisasi mRNA

Variasi yang terjadi dalam ekstraksi RNA merupakan masalah dalam analisis RNA. Hal ini dapat mempengaruhi jumlah mRNA yang akan diamplifikasi. Penentuan ini penting karena mRNA adalah cetakan yang digunakan untuk mensintesis cDNA oleh enzim *reverse transcriptase* yang selanjutnya akan diubah menjadi *double strand DNA* oleh *Taq Polymerase*. Variasi pada jumlah mRNA ini akhirnya akan mempengaruhi analisis level RNA. Oleh karena itu, diterapkan beberapa strategi atau disebut normalisasi untuk meminimalisir variasi yang mungkin yang terjadi. Beberapa langkah normalisasi yang dapat dilakukan adalah menyeragamkan jumlah sel yang akan diekstraksi

sehingga dapat meminimalisasi variasi yang mungkin terjadi (Huggett et al., 2005). Langkah selanjutnya adalah penyeragaman jumlah total RNA yang akan digunakan dalam proses RT-PCR. Penyeragaman ini penting karena masukan untuk proses RT-PCR harus sama agar pengukuran level RNA yang dilakukan lebih akurat (Bustin, 2000). Selain penyeragaman jumlah RNA, kontrol terhadap kualitas RNA juga perlu dilakukan untuk menjamin kemurnian total RNA (Bustin dan Nolan, 2004). Langkah lainnya adalah normalisasi atau standarisasi mRNA dengan menggunakan *housekeeping genes* sebagai indikator (Radonic et al., 2004). Ekspresi *housekeeping genes* ini telah dipelajari baik dalam sel normal maupun sel kanker yang penggunaannya terbukti efektif dalam mengontrol variasi yang terjadi pada analisis RNA (Gale, 2005).

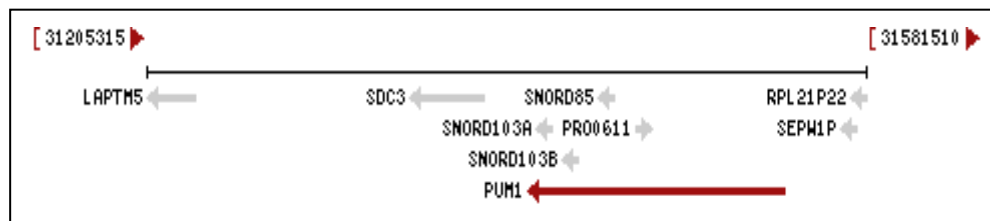
Housekeeping genes bertanggung jawab atas pemeliharaan dan aktivitas sel dan produknya penting bagi fisiologi sel. Gen ini disebut *housekeeping genes* karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan fungsional umum dan penting di sebagian besar tipe sel dan tidak bergantung pada histologi sel. *Housekeeping genes* yang ideal, ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada kondisi percobaan yang berbeda. Oleh karena itu, tidak semua *housekeeping genes* dapat digunakan sebagai indikator tetap atau penanda ekspresi. *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).

Ekspresi GAPDH telah banyak digunakan sebagai penanda kontrol karena dianggap ekspresinya stabil. Dalam studinya, Gale (2005) menganalisis ekspresi GAPDH pada sekitar seratus sampel normal, displastik dan tumor jaringan melalui eksperimen hibridisasi in situ. Mereka menemukan bahwa ekspresi GAPDH semakin meningkat pada sampel normal, displastik dan tumor. Studi lain dilaporkan bahwa GAPDH pada kanker payudara diregulasi oleh estradiol dan menunjukkan ekspresinya bergantung pada dosis estradiol yang diberikan sehingga penggunaan GAPDH sebagai *housekeeping genes* pada kanker payudara tidak tepat (Revilion et al., 2000).

Universitas Indonesia

Pada studi yang dilakukan oleh Lyng, et al (2008) menggunakan 8 *housekeeping genes* yang diuji pada 33 sampel sel kanker payudara dan hasilnya dianalisis dengan menggunakan statistik deskriptif yaitu geNorm dan NormFinder. Hasilnya menunjukkan bahwa gen PUM1 adalah *housekeeping genes* yang relatif konstan terhadap semua kombinasi sampel. Pada tahun 2007, McNeill dan rekan-rekan melakukan studi menggunakan 12 *housekeeping genes*. Mereka melakukan pengujian terhadap 27 sampel sel kanker payudara yang dianalisis dengan menggunakan dua model statistik yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa PUM1 adalah gen yang paling stabil dan dapat digunakan sebagai internal kontrol (*housekeeping genes*). Szabo, et al (2004) juga melakukan studi mengenai pemilihan *housekeeping gene* menggunakan model statistika untuk mengidentifikasi gen yang variasi ekspresinya paling minimum. Pada studi ini dinyatakan bahwa perubahan ekspresi dari PUM1 masih berada pada tingkatan yang stabil dibandingkan dengan 4 *housekeeping genes* lainnya yang diuji.

Housekeeping genes PUM1 (Pumilio homolog *Drosophila* varian 1). PUM1 merupakan gen yang terletak dalam kromosom manusia 1p35.2 (Gambar 2.3) dan mengkode keluarga protein PUF yang memiliki peran penting dalam proses pengikatan RNA. Protein ini memiliki hubungan dengan protein Pumilio pada *Drosophila*. Protein yang dikode oleh PUM1 ini memiliki bagian khusus untuk mengikat RNA dan menjadi regulator translasi dengan mengikat pada ujung 3' mRNA yang tidak diterjemahkan. Penemuan gen ini pada manusia diduga berperan penting dalam embriogenesis, pertumbuhan dan diferensiasi sel (National Center of Biotechnology Information, 2011).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 22 April 2011]

Gambar 2.3. Letak Gen PUM1 pada Kromosom Manusia

2.10. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu teknik amplifikasi segmen DNA spesifik yang dilakukan secara *in vitro*. Amplifikasi segmen DNA spesifik tersebut dapat dilakukan dalam waktu yang singkat, dibandingkan dengan teknik amplifikasi dengan pengklonaan (Ausubel et al., 2003). Metode PCR digunakan untuk mengamplifikasi secara selektif suatu sekuen DNA target yang spesifik.

Adapun komponen-komponen yang diperlukan dalam proses PCR adalah (i) DNA cetakan (*template DNA*), yaitu fragmen DNA yang mengandung daerah sekuens tertentu yang akan diamplifikasi; (ii) dua primer oligonukleotida, yaitu segmen DNA berutas tunggal (15-25 basa nukleotida) yang menentukan bagian awal dan akhir dari daerah yang akan diamplifikasi; (iii) enzim DNA yang stabil terhadap pemanasan. Umumnya digunakan *Taq Polymerase* yang didapat dari *Thermus aquaticus*. Enzim ini akan menyalin bagian yang akan diamplifikasi; (iv) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang digunakan DNA polymerase untuk membentuk DNA baru. dNTP terdiri dari empat macam nukleotida, yaitu dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP; (v) kation Mg^{2+} yang diperlukan oleh *Taq Polymerase* untuk penambahan nukleotida; (vi) larutan penyangga yang umumnya mengandung 10 mM Tris pH 8,4, dan 50 mM KCl (Erlich, 1989).

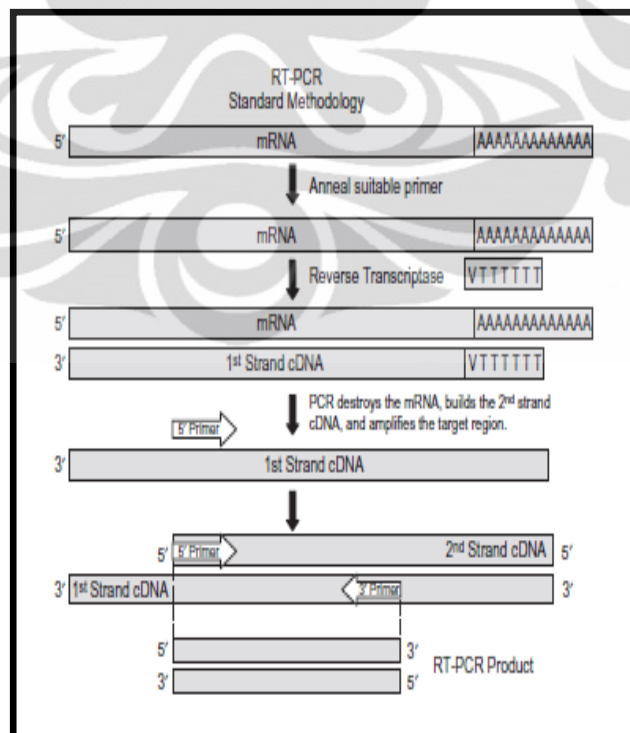
Teknik PCR bekerja dalam siklus yang berulang. Setiap siklus terdiri atas 3 tahapan reaksi, yaitu denaturasi yang merupakan proses pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal yang dilakukan dengan cara pemanasan pada suhu $94^{\circ}C$. Denaturasi juga dilakukan pada suhu tinggi untuk menghentikan semua reaksi enzimatik. Tahapan selanjutnya adalah *annealing* (pelekatan) atau hibridisasi, proses penempelan primer pada DNA *template* untai tunggal. *Temperature annealing* biasanya $3-5^{\circ}C$ di bawah *temperature melting* (T_m). Tahapan terakhir yaitu polimerisasi (*elongasi*), proses pemanjangan rantai DNA baru yang dimulai dari primer dengan dibantu enzim polimerase pada suhu $74^{\circ}C$ (Klug dan Cummings, 1994).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) adalah suatu teknologi dimana molekul RNA dikonversi menjadi sekuens *complementary DNA (cDNA)* dengan menggunakan reverse transcriptase (RT), dan cDNA yang terbentuk diamplifikasi dengan prinsip yang sama dengan PCR standar. Metode

Universitas Indonesia

ini mempunyai keunggulan lain jika dibandingkan dengan metode tradisional lainnya dalam menganalisa RNA yaitu dapat digunakan untuk analisa kuantitatif. Selain itu, keuntungan lainnya adalah tingkat sensitifitasnya yang tinggi dapat menganalisa RNA dalam jumlah yang sedikit dan dalam waktu yang relatif singkat (Farrell, 2010).

Teknik RT-PCR dapat dilakukan dengan 2 cara, yaitu *one-step* RT-PCR dan *two-step* RT-PCR. *One-step* RT-PCR merupakan teknik PCR yang digunakan untuk mengubah RNA menjadi DNA melalui satu tahapan reaksi. Teknik ini melibatkan dua enzim transkriptase, yaitu *Omniscript* dan *Sensiscript reverse transcriptase*. Kedua enzim ini dapat meningkatkan efisiensi reaksi *reverse transcriptase* dengan menghambat struktur sekunder dan dapat digunakan untuk jumlah *template* yang terbatas. *Two-step* RT-PCR merupakan teknik PCR untuk mengubah RNA menjadi DNA melalui dua kali tahapan reaksi. Tahap pertama adalah pembuatan cDNA dengan menggunakan *Omniscript reverse transcriptase* dan tahapan berikutnya amplifikasi sekuen target menggunakan enzim *HotStar Taq DNA polymerase* (Machura dan Missel, 2003).



[Sumber : Farrell, 2010]

Gambar 2.4. Proses RT-PCR

2.11. Elektroforesis Gel

Elektroforesis merupakan suatu teknik untuk memisahkan atau menguraikan molekul bermuatan di dalam medan listrik (Brown, 1999). Menurut Boyer (2000), elektroforesis adalah suatu gaya yang digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan perbedaan ukuran dan muatan molekul dengan melewati molekul pada matriks gel. Prinsipnya adalah memisahkan molekul DNA, RNA, dan protein berdasarkan ukuran dan berat molekulnya yang bergerak melalui pori-pori gel di bawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tertentu (Sambrook dan Russell, 2001). Elektroforesis digunakan untuk memisahkan protein spesifik dan fragmen DNA dengan ukuran yang berbeda sehingga banyak digunakan untuk menentukan ukuran dari suatu fragmen DNA, menentukan berat molekul suatu protein, menentukan titik isoelektrik protein, dan menentukan kemurnian suatu protein yang telah diisolasi (Seidman dan Moore, 2000).

Terdapat dua jenis gel yang umum digunakan dalam elektroforesis, yaitu agarosa dan poliakrilamid. Agarosa umum digunakan untuk memisahkan fragmen DNA (Seidman dan Moore, 2000). Gel agarosa dapat memisahkan fragmen DNA dengan ukuran 50-20.000 pb (pasang basa) sedangkan gel poliakrilamid digunakan untuk pemisahan fragmen DNA berukuran kecil (5-500 pb).

Gel akrilamid digunakan sebagai fase diam dalam gel elektroforesis dengan konsentrasi bervariasi yaitu 8%, 10% dan 12%. Gel yang sudah dibuat kemudian direndam dalam *chamber*, dilengkapi elektroda positif dan negatif, yang berisi larutan dapar lalu dialiri arus listrik. DNA bermuatan negatif sehingga DNA akan bergerak menembus pori gel dari elektroda negatif menuju elektroda positif. Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh tegangan yang digunakan, konsentrasi akrilamid, dan ukuran DNA. Molekul yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang lebih besar (Franks, 1999). Visualisasi molekul DNA dilakukan dengan cara merendam gel dalam zat warna etidium bromida. Etidium bromida mampu berpendar apabila diberi sinar ultraviolet karena etidium bromida mampu mengikat molekul DNA dengan cara berinteraksi di antara basa DNA (Lodge et al., 2007).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

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

3.2. PERIJINAN DARI KOMISI ETIK

Persetujuan etis telah diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2009 dengan nomor 196/PT02.FK/ETIK/2009 untuk payung penelitian yang berjudul “Analisis Pluripotensi dan Ekspresi *Mangane Superoxide Dismutase* (MnSOD) pada sel punca kanker payudara” sebagaimana terlampir pada Lampiran 13.

3.3. BAHAN

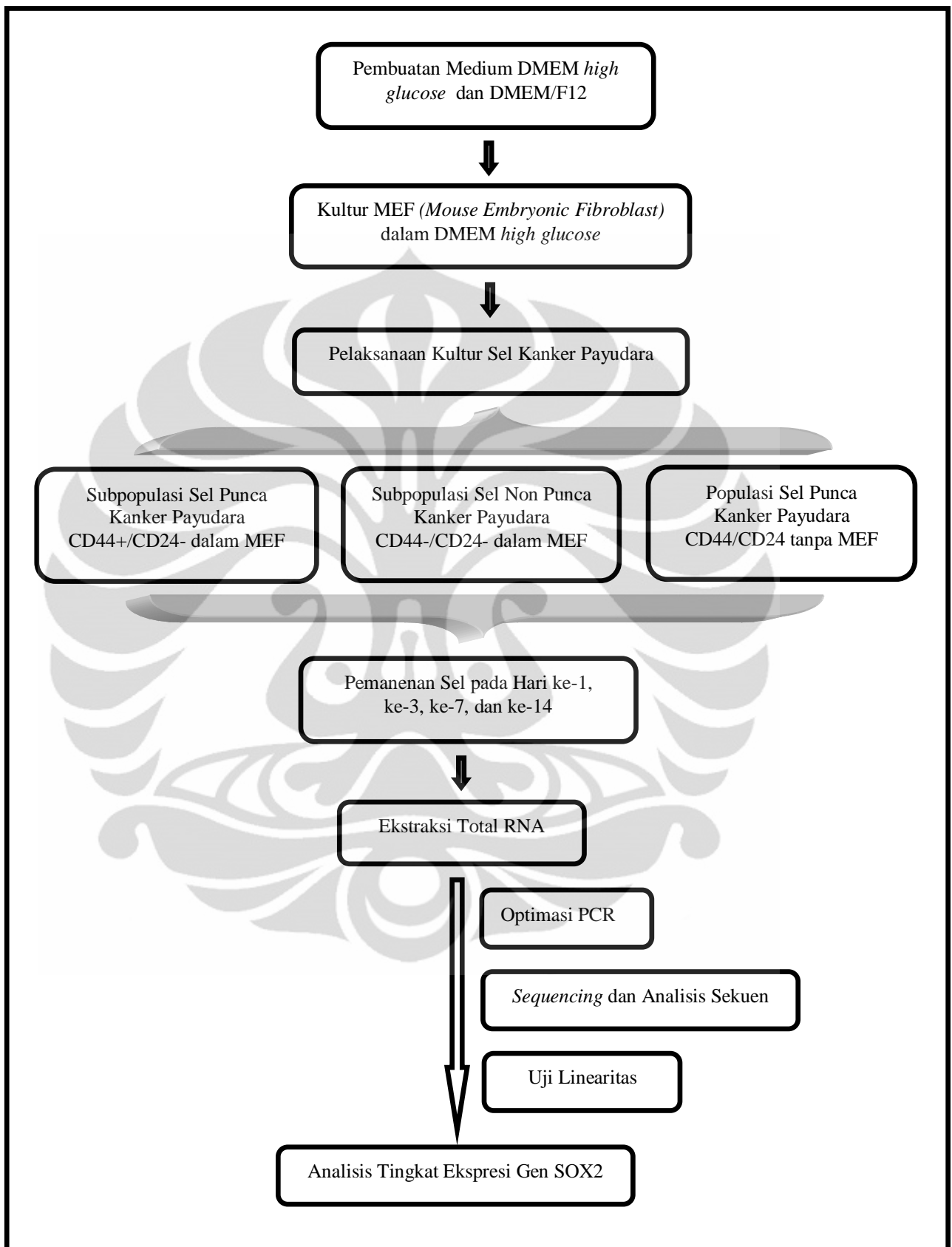
Sampel yang digunakan adalah kultur primer sel kanker payudara CS14 kanker yang berasal dari pasien kanker payudara wanita Indonesia. Sampel ini diperoleh dari jaringan primer hasil pengangkatan tumor pasien penderita kanker payudara dari Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM) pada bulan Agustus 2009 sampai April 2010 (IHVCB) dan sudah melalui serangkaian proses panjang yang dilakukan oleh tim IHVCB UI, mulai dari pengambilan jaringan hingga pengkulturan sel primer kanker payudara. Kultur sel primer CS14 kanker merupakan sampel yang dikoleksi oleh tim peneliti pada payung penelitian diatas.

Bahan yang digunakan adalah *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) *stock solution* (IHVCB), DMEM *High Glucose*, DMEM/F12 [Gibco, USA], HEPES (*N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*) [Invitrogen, USA], FBS (*Fetal Bovine Serum*) [Invitrogen, USA], Penstrep® (penisilin 10000 UI dan streptomisin 10 mg per ml dalam natrium klorida 0,9%) [Sigma, USA], Gentamisin 50 mg/ml [Sigma USA], natrium bikarbonat 7,5 % [Invitrogen, USA], PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA (2,5 g porcine

trypsin dan 0,2 g EDTA dalam HBSS) [Sigma, USA], trypan blue [Sigma, USA], *RNeasy Mini Kit* [Qiagen, Jerman], β -mercaptoetanol, *OneStep RT-PCR* [Qiagen, Jerman], *QIAquick PCR Purification Kit* [Qiagen, Jerman], *RNAse inhibitor* [Invitrogen, USA], *RNAse-free water* [Qiagen, Jerman], primer SOX2 (FWD 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3'; REV 5'-CATGGAGTTGTACTGCAGG-3') [Eurogentec, Singapore]; PUM1 (FWD 5'-TGAGGT GTGCACCATGAAC-3'; REV 5'-CAGAATGTGCTTGCCATAGG-3') [1st Base, Indonesia], MEF stock solution (IHVCB), akrilamid [Promega, USA], APS 10%, 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]. Cara pembuatan reagen dan dapar dapat dilihat pada Lampiran 10.

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 μ l; 200 μ l [Axigen], tabung konikal 50 ml; 15 ml dan 10 ml [Falcon dan BD Biosciences, 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], hemocytometer [Assistent, Jerman], autoklaf [Hirayama, Jepang], *ice maker* [Hirayama, Jepang] dan alat-alat lain yang biasa dipergunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.



Gambar 3.1. Skema Cara Kerja

3.5. CARA KERJA

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan berasal dari CS14 kanker. Selanjutnya dilakukan proses penyortiran yang dilakukan oleh tim IHVCB UI, untuk memperoleh subpopulasi sel CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- dengan menggunakan MINIMACs *cells separator* (Lampiran 1). Subpopulasi sel CD44+/CD24- dan CD44-/CD24- serta populasi sel kanker payudara selanjutnya ditanam sesuai dengan perlakuan. Perlakuan pertama, subpopulasi sel punca kanker payudara (CD44+/CD24-) ditumbuhkan dalam MEF. Perlakuan kedua, subpopulasi sel non punca kanker payudara (CD44-/CD24-) ditumbuhkan dalam MEF. Perlakuan ketiga, populasi sel kanker payudara CD44/CD24. Pemanenan sel dilakukan pada hari ke-1, ke-3, ke-7, dan ke-14 yang selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap tingkat ekspresi gen SOX2 dengan normalisasi menggunakan gen PUM1 sebagai kontrol dalam. Skema kerja dan alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

3.5.1. Pembuatan Medium Kultur

Medium yang digunakan untuk kultur sel kanker payudara adalah DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*). Larutan medium kemudian dibagi ke dalam beberapa bagian masing masing sebanyak 40 ml dan ditempatkan dalam *conical tube* 50 ml. Dalam masing-masing bagian dimasukan Penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) dan Gentamisin 1/100 volume medium. Setelah itu dihomogenkan dengan cara membolak-balik *conical tube*, kemudian disaring dengan *cell strainer* 0,20 µm. Medium yang sudah disaring kemudian disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan. Komposisi DMEM/F12 dapat dilihat pada Lampiran 12.

Medium DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*) digunakan untuk menumbuhkan *feeder layer* MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*). Larutan medium disterilisasi dengan menggunakan penyaring vakum yang kemudian dibagi ke dalam beberapa bagian masing masing sebanyak 43 ml dan ditempatkan dalam *conical tube* 50 ml. Ke dalam masing-masing bagian

dimasukan *buffer* HEPES sebanyak 5 ml, 500 µl FBS (*Fetal Bovine Serum*), 500 µl gentamisin, 500 µl Penstrep® (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) dan 500 µl natrium bikarbonat. Setelah itu dihomogenkan dengan cara membolak-balik *conical tube*, kemudian disaring dengan *cell strainer* 0,20 µm. Medium yang sudah disaring kemudian disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan (Dulbecco dan Freeman, 1959). Komposisi DMEM *High Glucose* dapat dilihat pada Lampiran 11.

3.5.2. Penggantian Medium

Kultur sel kanker perlu diganti mediumnya jika medium sudah berubah warna dari merah kekuningan menjadi orange kekuningan. Perubahan warna pada medium disebabkan terjadinya perubahan pH yang menandakan medium sudah kehilangan nutrisi yang dikandungnya. Kultur dikeluarkan dari inkubator dan diletakan dengan hati-hati pada wadah tertutup yang sebelumnya telah disemprot dengan alkohol 70%. Kemudian kultur dikeluarkan dari wadah tertutup ke BSC yang telah disiapkan. Setelah itu medium dimasukkan ke tabung *falcon* 15 ml dengan menggunakan pipet dan kultur diisi dengan medium baru sebanyak 1 ml. Lakukan pada semua kultur sel. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, pelet sel diresuspensi dengan 2 ml medium kemudian dimasukan kembali ke kultur pada wadah tertutup, yang telah disemprot alkohol 70%, untuk dikembalikan ke inkubator.

3.5.3. Pelaksanaan Kultur Sel

Sampel yang akan digunakan adalah kultur primer sel kanker payudara CS14 kanker. Pelaksanaan kultur sel kanker payudara dalam DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) dilakukan dengan 3 perlakuan berbeda, dimana sebelumnya melalui proses penyortiran yang dilakukan oleh tim IHVCB (Lampiran 1) sehingga diperoleh subpopulasi sel CD44+/CD24- dan CD44-/CD24-. Perlakuan pertama, subpopulasi sel punca kanker payudara (CD44+/CD24-) ditumbuhkan dalam MEF yang telah membentuk *feeder layer*. Perlakuan kedua, subpopulasi sel non punca kanker

payudara (CD44-/CD24-) ditumbuhkan dalam MEF yang telah membentuk *feeder layer*. Perlakuan ketiga, populasi sel kanker payudara CD44/CD24.

Sebelum dilakukan ko-kultur sel kanker payudara, dilakukan kultur MEF untuk membentuk *feeder layer* menggunakan medium DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*). Suspensi sel tunggal MEF dalam vial yang telah dipindahkan dari nitrogen cair kemudian dilakukan proses *thawing* pada *water bath* dengan suhu 37⁰ C. Isi vial dipipet dan sel kemudian dipindahkan ke dalam tabung konikal serta ditambahkan 2 ml medium untuk kultur MEF. Selanjutnya disentrifus selama 5 menit. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi dengan 1 ml medium DMEM *High Glucose*. Suspensi sel dipindahkan ke sumur (*well*) dan ditambahkan medium hingga volume 3 ml. MEF dibiarkan tumbuh selama kurang lebih tiga hari hingga *feeder layer* terbentuk yang selanjutnya siap di ko-kultur dengan sel kanker payudara.

3.5.4. Pemanenan Kultur Sel Kanker Payudara

Pemanenan kultur sel dilakukan pada hari ke-1, ke-3, ke-7 dan ke-14. Pemanenan kultur sel dengan penambahan *feeder layer* MEF dilakukan dengan *splitting* yaitu dengan memindahkan medium dari sumur (*well*) ke tabung sentrifus. Selanjutnya, sel ditambahkan Kolagenase IV 10 mg/ml sebanyak 1 ml dan diinkubasi selama 30 menit atau hingga sel lepas dari *feeder layer* MEF. Kemudian sel dicuci 2 kali masing-masing dengan 1 ml medium. Untuk kultur sel tanpa MEF, pemanenan dilakukan dengan memindahkan medium DMEM/F12 ke *conical tube* kemudian sel dicuci dengan PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) sebanyak 2 kali masing-masing 1 ml. Selanjutnya, dimasukkan 1 ml tripsin dan ditunggu selama 15-20 menit atau hingga sel lepas. DMEM/F12 sebanyak 1 ml ditambahkan untuk menginaktifasi tripsin kemudian dicuci kembali dengan 1 ml medium sebanyak 2 kali dan dipindahkan ke tabung sentrifus. Suspensi sel yang telah dikumpulkan dalam tabung sentrifus kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada 1000 rpm.

3.5.5. Ekstraksi Total RNA

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan *RNeasy Mini Kit^R* [Qiagen, Jerman] sesuai sertifikat analisis pada Lampiran 16. Sebelum diekstraksi, sel terlebih dahulu difoto pertumbuhannya. Setelah itu, sel dipanen dan disentrifugasi selama 10 menit pada 1000 rpm. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 1 ml medium dan dilakukan penghitungan jumlah sel. Larutan medium ini kemudian dipipet sebanyak 10 μ l kemudian dicampur dengan 10 μ l *trypan blue* dan 80 μ l PBS. Campuran tersebut dihomogenkan dengan pemipetan dan dimasukkan ke dalam *hemocytometer*. Sel kemudian dihitung dengan bantuan mikroskop. Larutan medium yang sudah dihitung jumlahnya kemudian diseragamkan jumlahnya. Selanjutnya, disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang untuk mendapatkan pelet sel.

Sel yang dipanen ditambahkan dapar RLT sebanyak 350 μ l dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan tersebut dipindahkan ke *QIAshredder Spin Column* yang ditempatkan pada tube 1 ml dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C selama 2 menit. Kemudian ditambahkan satu bagian etanol 70% dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam *RNeasy Spin Column* dan ditempatkan pada tube 1 ml, ditutup dengan baik kemudian disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 12000 rpm dan suhu 4°C selama 15 detik. *RNeasy Spin Column* dilepaskan dari tube 1 ml dan cairan dibuang dari tube tersebut dan dipasang kembali pada tube 1 ml yang telah dibuang cairan di dalamnya, lalu ditambahkan dapar RW1 sebanyak 700 μ l, ditutup penutup dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik.

Kolom dilepaskan dari tube 1 ml dan cairan dibuang dari tube tersebut dan dipasang kembali pada tube 1 ml yang telah dibuang cairan di dalamnya, ditambahkan dapar RPE sebanyak 500 μ l, ditutup penutupnya dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Kolom dilepaskan dari tube 1 ml dan dibuang cairan di dalam tube tersebut dan dipasang kembali pada tube 2 ml yang telah dibuang cairan di dalamnya dan

ditambahkan dapar RPE sebanyak 500 μ l, ditutup penutup dengan baik, disentrifus dengan mikrosentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Kolom dilepaskan dan dibuang tube 1 ml beserta cairan di dalamnya dan dipasang pada tube 1 ml yang baru, ditutup penutup dengan baik dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 12.000 rpm dan suhu 4°C selama 1 menit. Kolom dilepaskan dan dibuang tube 1 mL beserta cairan di dalamnya dan dipasang pada tube 1 mL yang baru dan ditambahkan air bebas RNase sebanyak 30-50 μ L dan disentrifus dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C selama 1 menit untuk melarutkan RNA. Ulangi proses ini hingga didapat konsentrasi total RNA yang lebih banyak. Buang *RNeasy Spin Column* dan aliquot RNA ke dalam tube 0,5 ml masing masing sebanyak 10 μ l kemudian simpan cairan RNA pada *deep freezer* dengan suhu -80°C (RNeasy Mini Handbook, 2006).

3.5.6 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

Untuk menganalisa kemurnian total RNA yang telah diekstraksi, digunakan spektrofotometri NanoDrop ND-2000 (Gambar 4.21). Sebelum diukur total RNA hasil ekstraksi diencerkan dengan buffer TE steril (1:1 v/v). Pengenceran dengan *buffer* ini berguna agar menjaga pH dalam range 7,5-8,5 karena jika pH diluar dari range tersebut dapat mempengaruhi nilai ratio A260/280 (Wilfinger et al, 1997). Sebanyak 2 μ l campuran tersebut dipipet ke atas lapisan fiber optik dan diukur pada panjang gelombang 260 nm.

Sebelum digunakan sebaiknya permukaan optik bagian atas dan bawah dibersihkan dahulu dengan Kimwipe yang telah dibasahi dengan aquabidest. Software NanoDrop dibuka dan dipilih module "*Nucleic Acid*" lalu dilakukan inialisasi dengan menempatkan 1 μ l air bebas nuklease pada permukaan optik bagian bawah, diturunkan lengan dan diklik "*Initialize*" pada software NanoDrop. Setelah selesai, dibersihkan permukaan optik bagian atas dan bawah dengan *Kimwipes*. Selanjutnya, dilakukan *blank* measurement dengan menempatkan 1 μ l air bebas nuklease, ditutup lengan dan diklik "*Blank*" pada software NanoDrop. Setelah selesai dibersihkan kembali permukaan optik dengan

Kimwipes. Setelah selesai, ditempatkan kembali 2 μ l sampel RNA pada permukaan optik bagian bawah, ditutup lengan dan diklik “*Measure*”. Setelah selesai, dibersihkan kedua permukaan optik dengan *Kimwipes*[®] dan re-blank dengan 1 μ l air bebas nuklease. Pada pengukuran sampel RNA, perhatikan nilai 260/280. Nilai ini harus menunjukkan 1,8-2,1 untuk menentukan bahwa RNA telah murni (Ausubel, 2001; NanoDrop 2000 Spectrophotometer User’s Manual, 2009)

3.5.7. Optimasi RT-PCR

Kondisi RT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum. *Temperature annealing* biasanya 3-5⁰C di bawah *temperature melting* (T_m). T_m primer untuk SOX2 adalah 64⁰C sedangkan untuk PUM1, nilai T_m adalah 60⁰C. Primer yang digunakan untuk *one step* RT-PCR adalah primer spesifik untuk gen SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida manusia (Lampiran 2 dan 3). Primer ini SOX2 dan 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). Penggunaan primer spesifik dapat meningkatkan efektifitas dan sensitifitasnya karena hanya menempel pada sekuens spesifik dari gen yang akan di analisis (Bustin dan Nolan, 2004). Urutan basa primer pada proses RT-PCR dapat dilihat pada Tabel 3.1.

1. Untuk gen SOX2

- a. Reverse Transcriptase : 50⁰C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95⁰C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali :
 - Tahap denaturasi : 94⁰C; 30 detik
 - Tahap pelekatan : 55,0⁰C; 57,2⁰C 58,8⁰C; 60,0⁰C; 1 menit
 - Tahap perpanjangan : 72⁰ C; 1 menit
- d. Pasca-siklus :
 - Pasca perpanjangan : 72⁰C; 10 menit
 - Penyimpanan : 4⁰C; selamanya

2. Untuk gen PUM1

- a. Reverse Transcriptase : 50⁰C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95⁰C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali :
 - Tahap denaturasi : 95⁰C; 30 detik
 - Tahap pelekatan : 55⁰C; 57,2⁰C; 58,8⁰C; 60,0⁰C; 1 menit
 - Tahap perpanjangan : 72⁰C; 1 menit
- d. Pasca-siklus :
 - Pasca perpanjangan : 72⁰C; 10 menit
 - Penyimpanan : 4⁰C; selamanya

3.5.8 *Sequencing* dan Analisis Hasil Sekuen

Sebelum dilakukan *sequencing*, dilakukan purifikasi terhadap produk PCR untuk memurnikan dari bahan-bahan lainnya yang berada dalam campuran reaksi PCR. Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan teknik dari QIAGEN (2002). Sebanyak 40 µl produk PCR dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi dan dicampur dengan 200 µl *buffer* PB. Campuran kemudian dipindahkan ke dalam *QIAquick Spin Column* (QSC) yang pada bagian bawahnya telah diletakkan tabung koleksi. Tabung tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu yang tertampung pada tabung koleksi dibuang, dan sebanyak 750 µl *buffer* PE (+etanol) ditambahkan ke dalam QSC, lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu yang tertampung pada tabung koleksi dibuang, tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit.

QIAquick Spin Column (QSC) kemudian diletakkan di atas tabung mikrosentrifugasi volume 1,5 ml yang steril dan ditambahkan sebanyak 40 µl *buffer* 1/3 EB. Campuran dalam QSC disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Residu yang tertampung di dalam tabung mikrosentrifugasi berupa produk PCR yang telah dipurifikasi. Sebanyak 4 µl hasil purifikasi kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel poliakrilamid 8% pada arus 400 mA, tegangan 100 V selama 55 menit.

Sequencing dilakukan oleh staf Laboratorium IHVCB UI berdasarkan metode *automated DNA sequencing* dengan *sequencer* Applied Biosystems 3130/3130 Genetic Analyzer. Proses *cycle sequencing* menggunakan primer SOX2 *forward* dan SOX2 *reverse* serta reagen ABI PRISM *big dye terminator* v.1.1 *cycle sequencing kit*. Siklus *sequencing* yang digunakan, yaitu denaturasi pada 96⁰ C selama 10 detik, *annealing* pada suhu 57⁰ C selama 5 detik, polimerisasi pada suhu 60⁰ C selama 4 menit dengan siklus 25 kali. Hasil *sequencing* berupa elektroferogram selanjutnya diubah dalam format FASTA untuk kemudian dilakukan *nucleotide* BLAST (BLASTN) pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> dan mengacu pada petunjuk manual dalam situs tersebut.

3.5.9. Pengukuran dengan RT-PCR (Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook)

Penyiapan RT-PCR ini menggunakan *Qiagen OneStep RT-PCR* [Qiagen] sesuai sertifikat analisis pada Lampiran 17. Ke dalam mikro tube 0,5 ml ditambahkan masing masing 2 µl 5x *Qiagen OneStep RT-PCR buffer*, 2 µl *Q-solution*, 0,4 µl dNTP mix 10 mM, 0,6 µl Primer Forward 10 mM, 0,6 µl Primer Reverse 10 mM, 0,1 µl RNase inhibitor, 0,4 µl *Enzyme Mix*, 0,25 µl MgCl, 1,65 µl air bebas nuklease dan 2 µl RNA cetakan (RNA cetakan yang digunakan adalah RNA sampel dan RNA standar) yang sudah disamakan konsentrasinya. Volume akhir 10,0 µl. Untuk kontrol negatif, tidak ditambahkan RNA cetakan dan air bebas nuklease yang ditambahkan 3,65 µl sehingga volume akhirnya 10,0 µl. Penyiapan RT-PCR ini harus dilakukan dalam es untuk menjaga agar enzim tidak bekerja sebelum dimasukkan kedalam mesin PCR.

Urutan basa-basa atau sekuens primer untuk gen penyandi sel punca dapat dilihat pada Tabel 3.1. Cetakan RNA yang akan digunakan untuk proses RT-PCR sebelumnya harus disamakan konsentrasinya. Penyeragaman ini dilakukan hingga konsentrasi cetakan RNA mencapai 3,0 ng/µl. Penyeragaman ini dilakukan untuk cetakan RNA yang berasal dari semua sampel. Setelah dilakukan penyeragaman ditambahkan 1 µl RNA inhibitor untuk 20 µl total RNA yang telah diencerkan.

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

1. Untuk gen SOX2

- a. Reverse Transcriptase : 50°C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95°C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali :
 - Tahap denaturasi : 94°C; 30 detik
 - Tahap pelekatan : 58,8°C; 1 menit
 - Tahap perpanjangan : 72°C; 1 menit
- d. Pasca-siklus :
 - Pasca perpanjangan : 72°C; 10 menit
 - Penyimpanan : 4°C; selamanya

2. Untuk gen PUM1

- a. Reverse Transcriptase : 50°C; 30 menit
- b. Pra-siklus : 95°C; 15 menit
- c. Siklus 37 kali :
 - Tahap denaturasi : 95°C; 30 detik
 - Tahap pelekatan : 55°C; 1 menit
 - Tahap perpanjangan : 72°C; 1 menit
- d. Pasca-siklus :
 - Pasca perpanjangan : 72°C; 10 menit
 - Penyimpanan : 4°C; selamanya

3.5.10. Uji Linearitas

Uji linearitas dilakukan untuk mengetahui jumlah RNA standar yang diperlukan pada proses RT-PCR. Uji linearitas dilakukan dengan melakukan RT-PCR dan RNA yang digunakan diencerkan dengan konsentrasi 2 ng/μl, 4 ng/μl, dan 6 ng/μl. Hasil ampikon yang dianalisis gel poliakrilamid kemudian diukur intensitasnya. Hasil pengukuran intensitas dibuat persamaannya kemudian digambarkan dalam bentuk kurva untuk menentukan nilai r^2 dari hasil ampikon gen.

3.5.11. Pengukuran Tingkat Ekspresi Gen SOX2

Cetakan RNA yang digunakan berasal dari ekstraksi subpopulasi sel punca kanker payudara (CD44+/CD24-) yang telah diencerkan konsentrasinya sehingga diperoleh konsentrasi 2 ng/ μ l, 4 ng/ μ l, dan 6 ng/ μ l. Hasil pengukuran intensitas amplikon untuk gen SOX2 dan PUM1 kemudian diplot dalam kurva linearitas untuk mengetahui jumlah RNA yang teramplifikasi. RNA gen SOX2 yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan jumlah RNA PUM1 sebagai *housekeeping gene* untuk mendapatkan suatu nilai ratio tertentu. Nilai rasio yang diperoleh menggambarkan peningkatan tingkat ekspresi gen SOX2 pada subpopulasi sel punca kanker payudara (CD44+/CD24-), subpopulasi sel non punca kanker payudara (CD44-/CD24-) dan populasi sel kanker payudara CD44/CD24.

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

Akrilamid dibuat dengan konsentrasi 8%, yaitu dengan membuat campuran yang terdiri dari 3,3 ml air *Milipore*, 0,375 ml dapar TBE 10 x, 1 ml larutan akrilamid, 42,5 μ l 10% ammonium persulfat dan 4,25 μ l TEMED. Larutan tersebut dihomogenkan dengan pemipetan sebanyak 4x dan dengan cepat dituang ke dalam cetakan gel, sisir dipasang, lalu didiamkan hingga membeku selama 15-20 menit. Setelah membeku, sisir diangkat dan cetakan dipindahkan ke wadah elektroforesis. Wadah tersebut lalu diberi dapar TBE hingga menggenangi permukaan gel akrilamid.

Sebanyak 4 μ l larutan hasil RT-PCR ditambahkan dengan 2 μ l loading dye diatas kertas parafilm. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel yang tersedia dengan hati-hati. Sebanyak 3 μ l 100bp Gene Ruler (Gambar 4.26) ditambahkan sebagai penanda. Elektroforesis dinyalakan dan kondisi diatur dengan tegangan sebesar 100 volt dan arus listrik 400 A. Kemudian alat dijalankan selama 55 menit. Setelah selesai dijalankan, gel akrilamid diambil dan direndam selama 1 menit dalam larutan etidium bromida yang telah diencerkan

dengan TBE 1x. Pita-pita amplikon diamati melalui UV transilluminator pada panjang gelombang 590 nm.

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

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

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

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

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Medium

Medium yang digunakan untuk menumbuhkan *feeder layer* MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) adalah DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) *High Glucose*. Pada DMEM *High Glucose* ditambahkan FBS 10% (*Fetal Bovine Serum*) untuk melekatkan sel pada dasar *well* dan berperan sebagai *growth factor* yang diperlukan pada proliferasi sel, natrium bikarbonat untuk menjaga pH, dan Penstrep untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Pada kultur subpopulasi maupun populasi sel kanker payudara, digunakan medium DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*). Penambahan Penstrep dan Gentamisin dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri dan jamur. Medium selanjutnya dihomogenkan dengan cara membolak-balikan tabung secara perlahan untuk menghindari timbulnya buih.

4.2. Penggantian Medium

Kultur sel kanker perlu diganti mediumnya ketika medium sudah berubah warna dari merah kekuningan menjadi orange kekuningan. Perubahan warna pada medium disebabkan medium sudah kehilangan nutrisi yang dikandungnya. Pergantian medium dilakukan pada hari ke-2, ke-5, ke-9, dan ke-12. Pada hari ke-9 tidak dilakukan pergantian medium untuk *well* ke-3 karena medium belum berubah warna. Sebelum dilakukan pergantian medium maka kultur diamati terlebih dahulu dengan mikroskop (Gambar 4.20) untuk memastikan sel dalam keadaan melayang atau melekat pada dasar *well*. Setelah diamati, ada sebagian sel yang melekat pada *feeder layer* MEF dan ada pula yang melayang sehingga larutan medium tidak dapat langsung dibuang karena dapat menyebabkan sel yang melayang ikut terbang. Larutan medium dipipet dari dalam *well* kemudian dimasukkan ke *conical tube* untuk disentrifugasi. Kultur sel yang sudah diambil mediumnya, ditambahkan medium baru sehingga kultur sel tidak mati. Pelet yang diperoleh dari hasil sentrifugasi selanjutnya diresuspensi dengan medium baru

secukupnya dan dimasukkan kembali ke kultur sel di dalam *well*. Larutan medium dapat ditambahkan kembali sesuai dengan volume yang diinginkan.

4.3. Pelaksanaan Kultur Sel Kanker Payudara

Pada kultur sel kanker payudara, dilakukan dalam DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*) dengan MEF sebagai *feeder layer*. Sampel yang digunakan adalah kultur primer sel kanker payudara CS14 kanker yang berasal dari pasien kanker payudara wanita Indonesia. Sampel ini sudah melalui serangkaian proses panjang yang dilakukan oleh tim IHVCB UI, mulai dari pengambilan jaringan hingga pengkulturan sel primer kanker payudara. Kultur sel primer kanker payudara CS14 kanker ini yang selanjutnya digunakan pada penelitian.

Proses penyortiran dilakukan terlebih dahulu dengan MINIMACs *separator cells* menggunakan prinsip antigen-antibodi untuk memperoleh subpopulasi sel yang diinginkan (Lampiran 1). Setelah melewati tahap penyortiran sel yang dilakukan oleh tim IHVCB-UI, diperoleh subpopulasi sel CD44+/CD24- dan subpopulasi sel CD44-/CD24- dari populasi sel kanker payudara CS14 kanker. Pelaksanaan kultur sel dilakukan dengan 3 perlakuan berbeda dan ditanam pada medium DMEM/F12. Perlakuan tersebut terdiri dari (i) subpopulasi sel CD44+/CD24- dan MEF; (ii) subpopulasi sel CD44-/CD24- dan MEF; (iii) populasi sel kanker payudara CD44/CD24 tanpa MEF. Ketiga kultur ditanam pada medium DMEM/F12. Masing-masing perlakuan ditanam sebanyak 34.000 sel (Gambar 4.12).

Sebelum kultur sel di ko-kultur dengan *feeder layer* MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*), maka dilakukan pengkulturan MEF yang dilakukan dalam DMEM *High Glucose* (*Dulbecco's Modified Eagle's Media*). Suspensi sel tunggal MEF yang telah diresuspensi medium DMEM *High Glucose* dipindahkan ke sumur (*well*) dan ditumbuhkan selama tiga hari hingga *feeder layer* terbentuk. Terbentuknya *feeder layer* ditandai dengan tumbuhnya lapisan *fibroblast* yang menempel pada *well* (Gambar 4.12). Lapisan *fibroblast* ini merupakan diferensiasi dari sel embrio mencit. *Growth factor* (GF) yang dihasilkan oleh MEF diperlukan

untuk mempertahankan pluripotensi dari sel sehingga sel yang di ko-kultur dengan MEF tidak terdiferensiasi (Amit et al., 2003; Jung et al., 2004).

Pada pengamatan secara mikroskopik, dapat diamati bahwa sel yang di ko-kultur dengan MEF memiliki densitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang tidak di ko-kultur dengan MEF. Pada perlakuan pertama dan kedua dimana sel di ko-kultur dengan MEF, terlihat adanya lapisan mammosfer berwarna kecoklatan yang melayang. Mammosfer menunjukkan adanya morfologi dari sel punca yang berbentuk bulat dan bergerombol. Suatu studi yang dilakukan oleh Grimshaw dan rekan-rekan pada tahun 2007 menunjukkan bahwa lapisan mammosfer berkorelasi dengan sifat tumorigenik yang dimiliki oleh sel kanker payudara. Namun, semakin besarnya mammosfer tidak berkorelasi dengan semakin tingginya sifat tumorigenik sel kanker. Ponti dan rekannya (2005) menemukan bahwa 95%-96% sel pada mammosfer yang dikultur dengan *cell lines* dan tumor payudara primer, negatif terhadap CD24 (CD24⁻).

4.4. Pemanenan Kultur Sel Kanker Payudara

Pemanenan kultur sel dilakukan pada hari ke-1, ke-3, ke-7 dan ke-14 (Gambar 4.13-4.16). Pada pemanenan hari pertama diperoleh jumlah sel pada masing-masing perlakuan adalah 2.650.000 sel/ml (sumur I); 1.750.000 sel/ml (sumur II); 225.000 sel/ml (sumur III). Setelah didapatkan jumlah sel pada tiap sampel lalu dilakukan penyeragaman jumlah sel pada tiap sampel menjadi 225.000 sel/ml. Pada pemanenan hari ketiga, diperoleh sebanyak 825.000 sel/ml (sumur I); 725.000 sel/ml (sumur II) dan 175.000 sel/ml (sumur III). Selanjutnya dilakukan penyeragaman jumlah sel menjadi 175.000 sel/ml. Pada pemanenan hari ketujuh, diperoleh jumlah sel 1.275.000 sel/ml (sumur I); 1.400.000 sel/ml (sumur II); 150.000 sel/ml (sumur III) yang kemudian dilakukan penyeragaman menjadi 150.000 sel/ml. Pada pemanenan hari terakhir (hari keempat belas), diperoleh 712.500 sel/ml (sumur I); 1.425.000 sel/ml (sumur II); 700.000 sel/ml (sumur III) yang kemudian dilakukan penyeragaman menjadi 700.000 sel/ml (lihat Tabel 4.1). Pada pemanenan hari ke-3 terlihat jumlah sel menurun. Hal ini diperkirakan adanya sebagian sel yang ikut terbuangnya pada saat dilakukan

pergantian medium di hari ke-2. Selain itu, diperkirakan sebagian sel mengalami kematian.

Pemanenan kultur sel dengan penambahan *feeder layer* MEF dilakukan dengan memindahkan medium dari sumur (*well*) ke *conical tube*. Sel ditambahkan Kolagenase IV dan diinkubasi sehingga sel lepas dari *feeder layer* MEF. Pencucian sel dengan medium bertujuan agar sel yang masih menempel dapat lepas. Untuk kultur sel tanpa MEF, setelah medium dipindahkan ke *conical tube*, dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak dua kali untuk memastikan bahwa tidak ada medium yang tertinggal karena adanya medium dapat menghambat kerja tripsin dalam melepaskan sel yang menempel pada dasar *well*. Selanjutnya, dimasukkan tripsin-EDTA dan ditunggu beberapa menit atau hingga sel lepas. Setelah itu ditambahkan medium yang berisi FBS untuk mengaktifasi tripsin.

Sel hasil pemanenan disentrifugasi dengan sentrifus sehingga diperoleh pelet sel. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan medium untuk dilakukan penghitungan jumlah sel. Perhitungan sel dilakukan menggunakan *haemocytometer* dan sel kemudian dihitung dengan bantuan mikroskop.

Hasil perhitungan sel kemudian dimasukkan kedalam rumus:

$$\text{Jumlah sel} = \frac{\text{jumlah sel hasil perhitungan}}{\text{ml}} \times \text{faktor pengenceran} \times 10.000$$

dengan faktor pengenceran 10

Penyeragaman jumlah sel sebelum diekstraksi dilakukan sebagai langkah awal dalam menormalisasi RNA.

4.5. Ekstraksi Total RNA

Ekstraksi dilakukan setelah pemanenan hari ke-1, ke-3, ke-7 hingga ke-14 dengan menggunakan kit dari Qiagen (RNeasy Mini Handbook, 2006). Pelet sel yang diperoleh kemudian ditambahkan buffer RLT yang sebelumnya telah ditambahkan β -mercaptoetanol. Penambahan β -mercaptoetanol bertujuan untuk menjaga keutuhan total RNA dengan menghambat kerja dari RNase (suatu enzim

yang mendegradasi RNA, dapat bekerja dalam konsentrasi rendah dan sangat stabil) dengan cara mereduksi ikatan disulfide sehingga dapat merusak konformasi enzim RNase. Penambahan buffer RLT berfungsi sebagai pendenaturasi protein karena mengandung garam guanidium tiosianat yang merupakan komponen penyusun membran sel yang bekerja dengan merangsang transfer group non polar ke dalam air sehingga lipofilisitas dapat ditingkatkan (RNeasy Mini Handbook, 2006).

Penambahkan etanol 70% setelah buffer RLT bertujuan untuk mengendapkan materi asam nukleat dan menghilangkan kontaminasi protein yang dapat terjadi sedangkan pencucian dengan buffer RW1 (mengandung guanidine tiosianat dan etanol) bertujuan agar pemecahan sel dan pengendapan materi asam nukleat berlangsung lebih efektif.

Kolom yang telah dicuci dengan buffer RPE sebanyak 2x kemudian disentrifugasi untuk mengeringkan membran dari etanol karena adanya etanol dapat menghambat reaksi RT-PCR. RNA yang berada di membran spin kolom dilarutkan dengan 40 μ l *RNAse free water*. Kualitas RNA harus terjaga agar tetap baik sehingga dilakukan *aliquot* larutan ke dalam tube PCR masing-masing 10 μ l dan disimpan dalam *deep freezer* -80° C.

4.6. Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

Hasil pengukuran untuk analisis kemurnian total RNA dengan spektrofotometer Nanodrop (Gambar 4.20). Sebelum diukur total RNA hasil ekstraksi diencerkan dengan buffer TE steril (1:1 v/v). Pengenceran dengan buffer ini berguna agar menjaga pH dalam range 7,5-8,5 karena jika pH diluar dari range tersebut dapat mempengaruhi nilai ratio A260/280 (Wilfinger et al, 1997). Sebanyak 2 μ l campuran tersebut dipipet ke atas lapisan fiber optik dan diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 280nm.

Hasil pengukuran didapatkan bahwa konsentrasi total RNA pada hari pertama hingga hari keempat belas dapat dilihat pada Tabel 4.2. Bervariasinya konsentrasi RNA hasil ekstraksi yang diperoleh disebabkan berbedanya jumlah penyeragaman sel yang dilakukan sebelum diekstraksi pada setiap perlakuan hari.

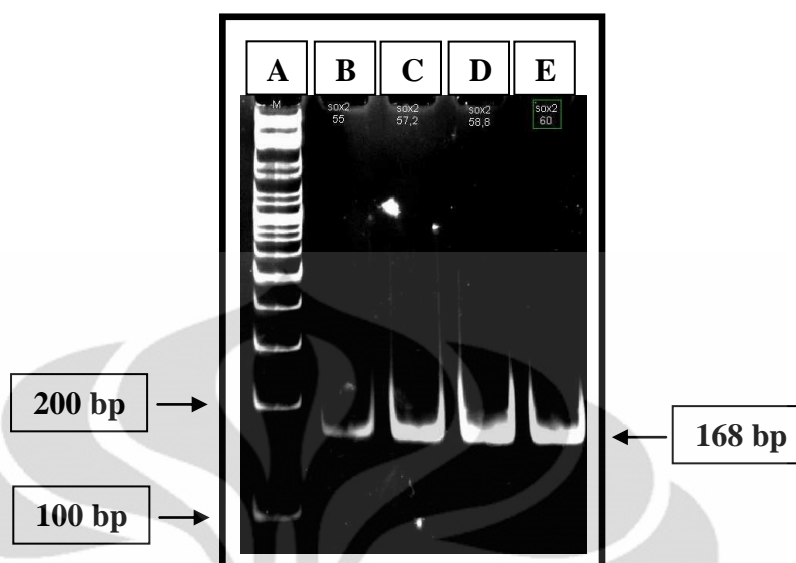
Penyeragaman jumlah sel dilakukan dengan menyamakan jumlah sel terkecil pada setiap perlakuan. Untuk itu, tahap normalisasi selanjutnya penting dilakukan untuk menyeragamkan konsentrasi total RNA hasil ekstraksi.

4.7. Optimasi RT-PCR

Primer yang digunakan untuk *one step* RT-PCR adalah primer spesifik untuk gen SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida manusia (Lampiran 4). Primer SOX2 (Lampiran 2) dirancang oleh tim IHVCB-UI dengan menggunakan software Bioedit (Hall, 1999) dan Clustal X (Larkin, 2007) sedangkan untuk sekuens primer PUM1 (Lampiran 3) diperoleh dari jurnal bioteknologi (Szabo, 2004). Penggunaan primer spesifik dapat meningkatkan efektifitas dan sensitifitasnya karena hanya menempel pada sekuens spesifik dari gen yang akan di analisis (Bustin dan Nolan, 2004). Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses RT-PCR, dapat dilihat pada Tabel 4.3.

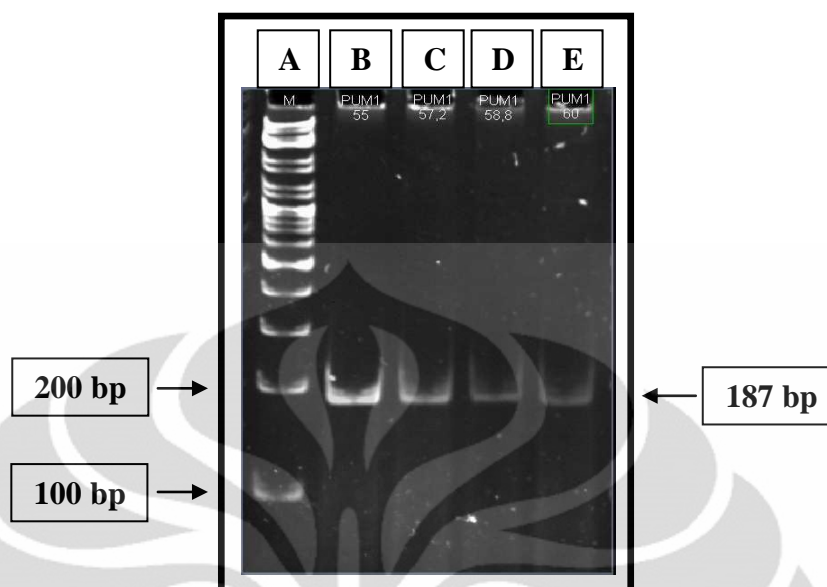
Untuk SOX2 dimana T_m primernya adalah 64°C , disusun suhu optimasinya adalah 55°C , $57,2^{\circ}\text{C}$, $58,8^{\circ}\text{C}$, dan 60°C sedangkan untuk PUM1, nilai T_m adalah 60°C dan disusun suhu optimasinya 55°C , $57,2^{\circ}\text{C}$, $58,8^{\circ}\text{C}$ dan $60,0^{\circ}\text{C}$. Hasil dari elektroforesis gel akrilamid 8% menunjukkan terdapat satu pita spesifik yaitu sekitar 160 bp pada suhu 55°C ; $57,2^{\circ}\text{C}$; $58,8^{\circ}\text{C}$; 60°C (Gambar 4.1).

Hasil pengukuran intensitas pada keempat suhu tersebut berturut-turut adalah 3323,500 pixel; 4094,000 pixel; 4094,000 pixel; 4094,000 pixel. Hasil pengukuran intensitas menunjukkan bahwa suhu $57,2^{\circ}\text{C}$; $58,8^{\circ}\text{C}$; 60°C memberikan intensitas yang sama besarnya. Oleh karena itu, suhu optimum untuk gen SOX2 menggunakan suhu $58,8^{\circ}\text{C}$ dimana pada suhu ini memberikan intensitas pita yang cukup kuat, menunjukkan satu pita spesifik pada ukuran sekitar 160 bp serta memiliki *average trace* yang paling besar (Tabel 4.4).



Gambar 4.1. Hasil optimasi PCR untuk SOX2 pada gel poliakrilamid 8% :
 A. Marker 100bp Gene Ruler; B. SOX2 suhu 55⁰C; C. SOX2 suhu 57,2⁰C;
 D. SOX2 suhu 58,8⁰C; E. SOX2 suhu 60⁰C.

Sedangkan untuk *housekeeping gene* yaitu PUM1 pada keempat suhu tersebut menunjukkan satu pita spesifik yaitu pada ukuran sekitar 180 bp. Hasil pengukuran intensitas berturut-turut adalah 3835,438 pixel; 2977,000 pixel; 1970,438 pixel; dan 2708,000 pixel (Tabel 4.4). Dari pengukuran intensitas menunjukkan bahwa suhu 55⁰C adalah suhu optimum untuk *housekeeping genes* PUM1 karena memberikan pita dengan intensitas paling kuat (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Hasil optimasi PCR untuk PUM1 pada gel poliakrilamid 8%:
 A. Marker 100bp Gene Ruler; B. PUM1 suhu 55⁰C; C. PUM1 suhu 57,2⁰C; D.
 PUM1 suhu 58,8⁰C; E. PUM1 suhu 60⁰C.

Teknik pendeteksian dengan menggunakan PCR (Gambar 4.20) akan efisien jika berada dalam kondisi optimal. Oleh karena itu, dilakukan optimasi *suhu annealing* (TA) agar diperoleh kondisi optimal sehingga menghasilkan produk amplifikasi yang sesuai dengan ukuran yang diharapkan dan memiliki intensitas yang kuat. Optimasi RT-PCR dengan satu langkah (*one step*) merupakan proses *reverse transcription* dan proses PCR yang dilakukan dalam satu proses. Penggunaan *one step* RT-PCR ini dipilih untuk mengurangi langkah kerja sehingga akan meningkatkan efisiensi dan efektifitas karena makin sedikit langkah kerja yang dilakukan. Teknik ini melibatkan dua enzim transkriptase, yaitu *Omniscript* dan *Sensiscript reverse transcriptase* yang dapat meningkatkan efisiensi reaksi *reverse transcriptase* dan dapat digunakan untuk jumlah *template* yang terbatas (Machura dan Missel, 2003).

Temperature annealing (TA) merupakan parameter penting untuk menentukan primer yang hanya akan melekat pada sekuen target. Selain itu, TA akan mempengaruhi penempelan primer pada *template* (Ryckhik, Spencer, dan

Rhoads, 1990). TA yang terlalu rendah mengakibatkan salah satu primer atau pasangan primer akan menempel ke sekuen lainnya selain menempel ke sekuen target yang diamplifikasi. Pada TA yang terlalu tinggi mengakibatkan produk amplifikasi yang dihasilkan akan berkurang karena penempelan primer ke sekuen target berkurang. Oleh karena itu, optimasi TA merupakan komponen penting dalam proses PCR karena *annealing* yang non spesifik dapat mengurangi hasil amplifikasi (Zippelius et al., 2000).

Pada reaksi PCR menggunakan produk Qiagen, akan mendapatkan reagen tambahan, yaitu *Q-Solution*. Reagen ini dapat meningkatkan reaksi PCR yang kurang optimal akibat komposisi *template* yang mengandung banyak struktur sekunder atau banyak mengandung nukleotida GC. Selain itu, *Q-Solution* tidak mengandung bahan berbahaya sehingga kemurnian PCR dapat terjamin. Proses amplifikasi akan lebih efisien dan dapat digunakan untuk reaksi PCR yang tidak berjalan baik dalam kondisi standar (Qiagen, 2006).

4.8. Sequencing dan Analisis Hasil Sekuen

Sebelum dilakukan *sequencing*, dilakukan purifikasi terhadap produk PCR untuk memurnikan dari bahan-bahan lainnya yang berada dalam campuran reaksi PCR. Purifikasi produk PCR dilakukan menggunakan teknik dari QIAGEN (2002). Hasil purifikasi divisualisasikan dengan elektroforesis gel poliakrilamid 8% dan menunjukkan pita yang spesifik pada daerah 160bp (Gambar 4.17). Prinsip purifikasi dengan menggunakan *QIAquick PCR Purification Kit* [QIAGEN], yaitu pengikatan cDNA dalam sampel yang akan diadsorpsi ke dalam membran gel silika, pencucian dengan *buffer*, dan pengelusan cDNA yang telah terikat pada membran gel silika.

Produk PCR untuk PCR *sequencing* perlu dipurifikasi untuk memurnikannya dari bahan-bahan lainnya yang berada dalam campuran reaksi PCR (dNTP, primer, *buffer*, dan $MgCl_2$). Produk yang sudah dipurifikasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi produk yang diperoleh yaitu 9,3 ng/ μ l sedangkan konsentrasi sebelum dilakukan purifikasi yaitu 50 ng/ μ l. Konsentrasi produk sebelum dipurifikasi lebih

tinggi dibandingkan dengan konsentrasi setelah dipurifikasi dikarenakan produk yang belum dipurifikasi masih mengandung bahan-bahan reaksi campuran reaksi PCR (dNTP, primer, *buffer*, dan $MgCl_2$). Produk yang telah dipurifikasi sudah terbebas dari bahan-bahan tersebut (Wilfinger et al., 1997).

Sequencing dilakukan oleh staf Laboratorium IHVCB UI berdasarkan metode *automated DNA sequencing*. Hasil elektroforegram yang diperoleh memperlihatkan 150 basa *forward* dan 151 basa *reverse* yang terbaca (Gambar 4.18 dan 4.19). Hasil tersebut dapat digunakan untuk mengetahui homologi sekuen peneliti dengan sekuen SOX2 pada GenBank melalui analisis BLASTN. Hasil *sequencing* dianalisis melalui program BLASTN pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Analisis BLASTN menunjukkan bahwa sekuen *forward* peneliti merupakan sekuen dari faktor transkripsi SOX2 dan memiliki persentase kemiripan (*maximum identity*) dengan *accession code* NT_005612.16 sebesar 96%, *accession code* NW_00838884.2 sebesar 96% dan *accession code* NW_921807.1 sebesar 96% pada NCBI (Lampiran 8 dan 9). Persentase *identity* sebesar 96% merupakan hasil yang baik karena hanya terdapat empat basa yang tidak sesuai dengan sekuen pada NCBI.

Pada analisis BLASTN sekuen *reverse* diperoleh kemiripan dengan sekuen dari faktor transkripsi SOX2. Persentase kemiripan (*maximum identity*) dengan *accession code* NT_005612.16 sebesar 97%, *accession code* NW_001838884.2 sebesar 97%, dan *accession code* NW_921807.1 sebesar 97% (Lampiran 8 dan 9). Persentase sebesar 97% merupakan hasil yang baik karena hanya terdapat tiga basa yang tidak sesuai dengan sekuen pada NCBI. Menurut Hall (2001), semakin besar persentase *identity* suatu sekuen dengan sekuen lain menunjukkan bahwa sekuen tersebut memiliki kemiripan yang tinggi.

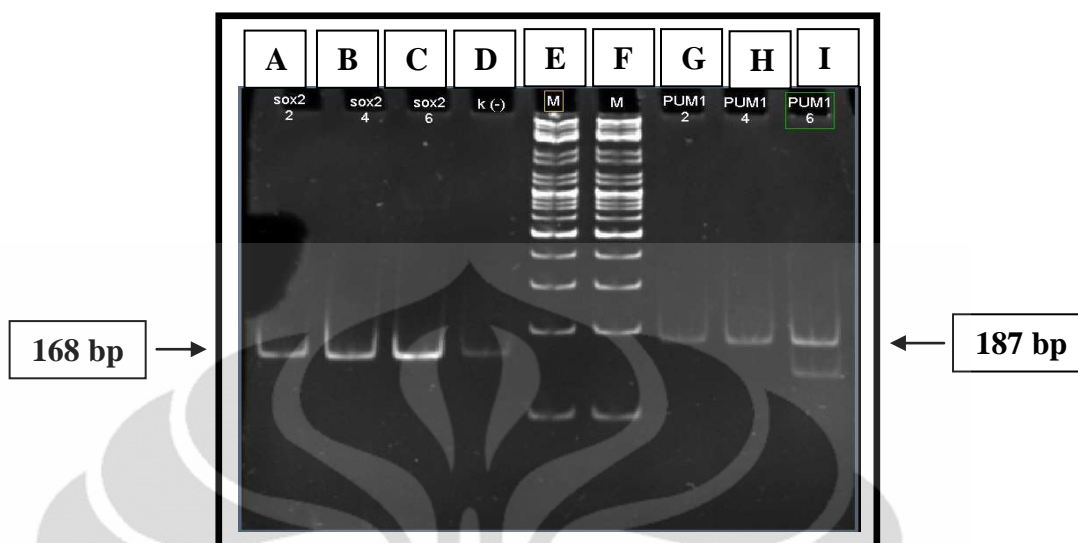
Sequencing bertujuan untuk mengetahui urutan nukleotida pada sekuen peneliti dengan sekuen yang terdapat pada GenBank sehingga homologi keduanya dapat ditampilkan. Proses *sequencing* menggunakan primer SOX2 F dan SOX2 R karena merupakan primer sekuen pengenalan untuk SOX2. Hasil *sequencing* berupa elektroforegram, yaitu hasil analisis yang menampilkan grafik *peak* yang mewakili basa nukleotida hasil pembacaan mesin *sequencer*. *Peak* tersebut

diterjemahkan menjadi basa-basa nitrogen untuk memudahkan analisis sekuen dengan program BLASTN. Hasil elektroferogram menunjukkan puncak sinyal (*peak*) yang jelas, hanya terdapat sedikit penumpukan pada beberapa puncak sinyal di awal. Adanya puncak sinyal yang tajam dan tidak bertumpuk merupakan salah satu indikasi hasil elektroferogram yang baik (Applied Biosystems, 2002).

4.9. Uji Linearitas RT-PCR

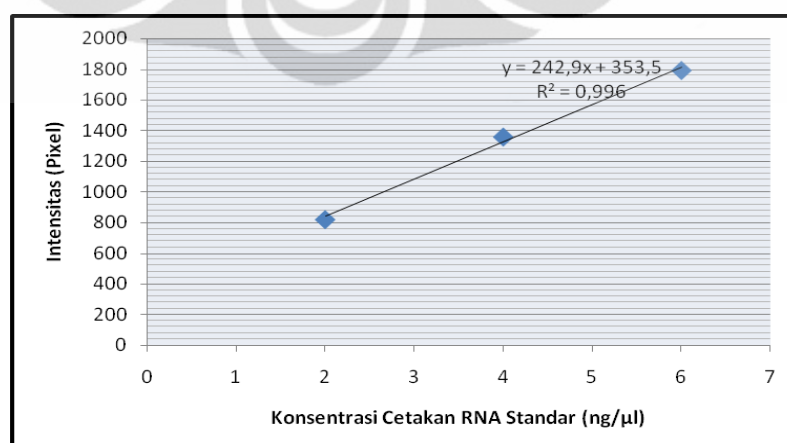
Uji linearitas dilakukan terhadap kedua gen, yaitu SOX2 dan PUM1 dengan menggunakan RNA cetakan sel punca kanker payudara CD44+/CD24- dengan konsentrasi 50 ng/μl dan diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi 2 ng/μl, 4 ng/μl, dan 6 ng/μl. RNA cetakan diencerkan dengan RNase-free water yang telah ditambahkan RNase inhibitor sebanyak 1 μl untuk 10 μl hasil pengenceran. Penambahan RNase inhibitor dilakukan untuk mencegah degradasi RNA oleh enzim RNase.

Uji linearitas dilakukan untuk mengetahui jumlah RNA standar yang diperlukan pada proses RT-PCR. RNA yang telah diencerkan tersebut selanjutnya digunakan sebagai cetakan RT-PCR untuk gen SOX2 dan PUM1 menggunakan suhu perlekatan yang sebelumnya telah dioptimasi. Untuk SOX2 menggunakan suhu perlekatan 58,8⁰C sedangkan PUM1 dengan suhu perlekatan 55⁰C. Pada Gambar 4.3 diperoleh analisis uji linearitas pada gel poliakrilamid 8% dengan terbentuknya pita SOX2 dan PUM1. Hasil pengukuran intensitas pada gen SOX2 berturut-turut adalah 2169,06 pixel, 2707,13 pixel, dan 3140,81 pixel sedangkan gen PUM1 berturut-turut adalah 1403,75 pixel, 1627,00 pixel, dan 2020,31pixel. Pada kontrol negatif terlihat munculnya pita dengan intensitas 1347,00 pixel sehingga intensitas yang akan diperhitungkan adalah intensitas gen dikurangi dengan intensitas kontrol negatif. Hasil intensitas pada uji linearitas SOX2 dan PUM dapat dilihat pada Tabel 4.5.

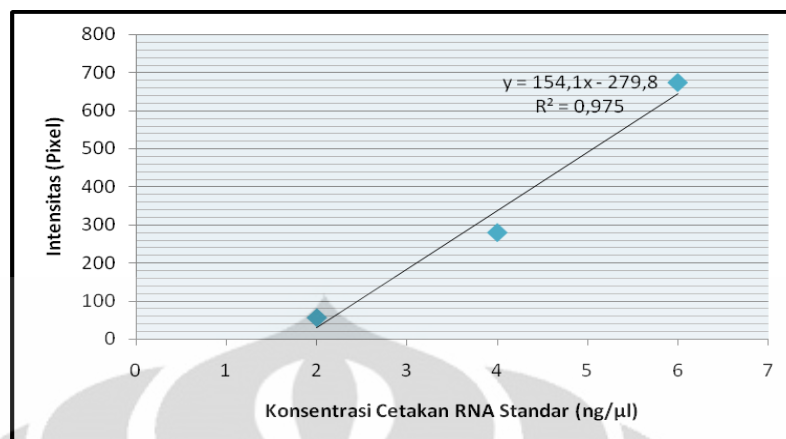


Gambar 4.3. Analisis uji linearitas SOX2 dan PUM1 pada gel poliakrilamid 8% :
 A. SOX2 konsentrasi 2 ng/μl; B. SOX2 konsentrasi 4 ng/μl; C. SOX2 konsentrasi 6 ng/μl; D. Kontrol (-); E dan F. Marker Gene Ruler 100bp; G. PUM1 konsentrasi 2 ng/μl; H. PUM1 konsentrasi 4 ng/μl; I. PUM1 konsentrasi 6 ng/μl.

Hasilnya diperoleh bahwa linearitas untuk SOX2 adalah $y = 242,9x + 353,5$ dengan $r^2 = 0,996$ (Gambar 4.4) sedangkan untuk PUM1 diperoleh $y = 154,1x - 279,8$ dengan $r^2 = 0,975$ (Gambar 4.5). Hasil uji linearitas dapat dilihat pada Tabel 4.5.



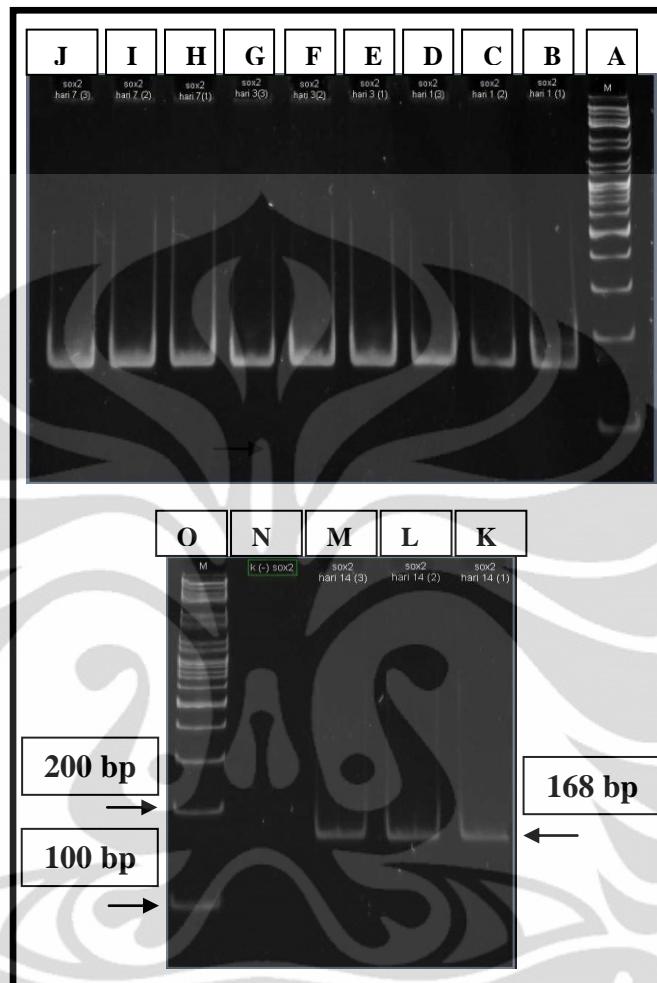
Gambar 4.4. Kurva Hasil Uji Linearitas SOX2



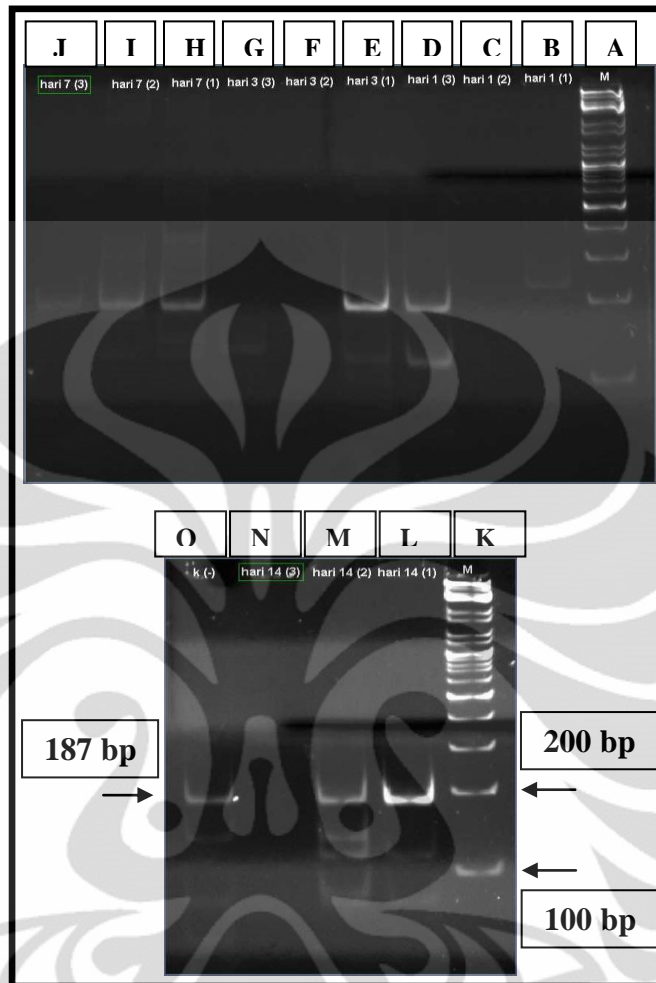
Gambar 4.5. Kurva Hasil Uji Linearitas PUM1

4.10. Analisis Tingkat Ekspresi Gen SOX2

Pengujian terakhir yang dilakukan adalah menganalisis level ekspresi dari gen SOX2 dengan normalisasi menggunakan PUM1 sebagai *housekeeping gene*. Sampel yang digunakan adalah CS14 kanker yang kemudian melalui proses penyortiran sehingga diperoleh subpopulasi sel punca (CD44+/CD24-) dan subpopulasi sel non punca (CD44-/CD24-). RNA cetakan yang digunakan pada proses RT-PCR adalah RNA cetakan dengan konsentrasi 3 ng/μl. Hasil ekspresi gen SOX2 dan PUM1 selanjutnya dianalisis menggunakan gel poliakrilamid 8% (Gambar 4.6 dan 4.7) dan diperoleh intensitas ampikon SOX2 dan PUM1 (Tabel 4.6).

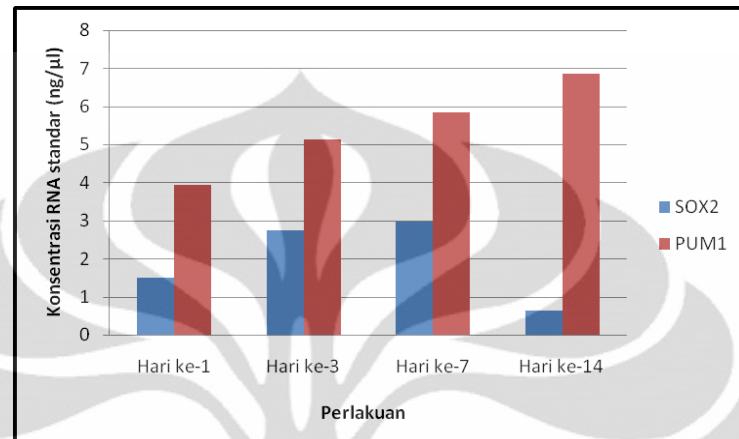


Gambar 4.6. Perbandingan Ekspresi mRNA SOX2 dengan RT-PCR yang Dianalisis pada Gel Poliakrilamid 8%: A. Marker Gene Ruler 100bp; B. (CD44+/CD24+)+MEF hari ke-1; C. (CD44-/CD24+)+MEF hari ke-1; D. (CD44-/CD24-) hari ke-1; E. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-3; F. (CD44-/CD24+)+MEF hari ke-3; G. (CD44-/CD24-) hari ke-3; H. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-7; I. (CD44-/CD24+)+MEF hari ke-7; J. (CD44+/CD24-) hari ke-7; K. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-14; L. (CD44-/CD24-)+MEF hari ke-14; M. (CD44+/CD24-) hari ke-14; N. Kontrol negatif; O. Marker Gene Ruler 100bp.

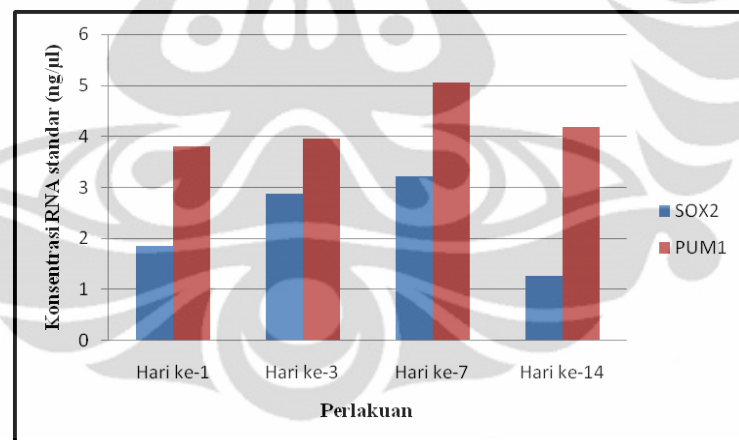


Gambar 4.7. Perbandingan ekspresi mRNA PUM1 dengan RT-PCR yang dianalisis pada gel poliakrilamid 8%: A. Marker; B. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-1; C. (CD44-/CD24-)+MEF hari ke-1; D. (CD44/CD24) hari ke-1; E. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-3; F. (CD44-/CD24-)+MEF hari ke-3; G. (CD44/CD24) hari ke-3; H. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-7; I. (CD44-/CD24)+MEF hari ke-7; J. (CD44/CD24) hari ke-7; K. Marker Gene Ruler 100bp; L. (CD44+/CD24-)+MEF hari ke-14; M. (CD44-/CD24-)+MEF hari ke-14; N. Kontrol negatif ;O. (CD44/CD24) hari ke-14.

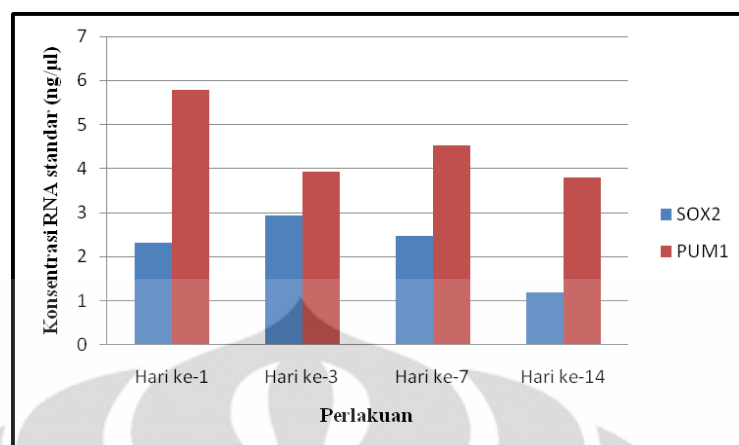
Ekspresi mRNA dari gen SOX2 dan PUM1 diplotting pada kurva linearitas yang sebelumnya telah diperoleh. Hasil plotting pada kurva menunjukkan jumlah konsentrasi RNA yang diperlukan pada proses RT-PCR.



Gambar 4.8. Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar gen SOX2 dan PUM1 pada Subpopulasi Sel CD44+/CD24-



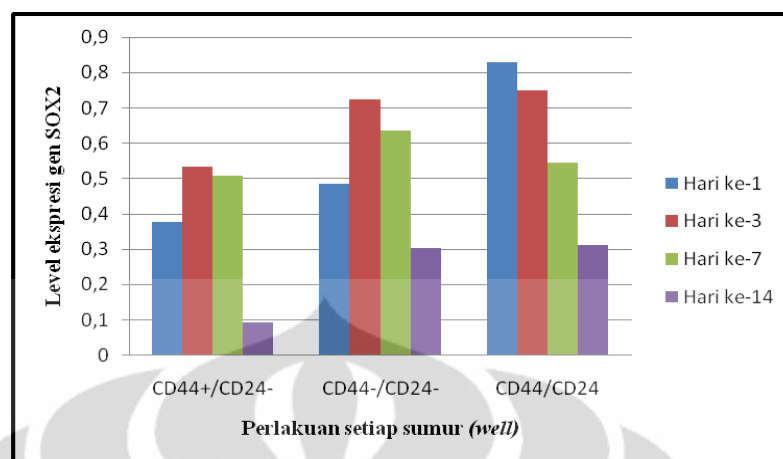
Gambar 4.9. Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar SOX2 dan PUM1 pada Subpopulasi sel CD44-/CD24-



Gambar 4.10. Kurva Perbandingan Konsentrasi RNA Standar SOX2 dan PUM1 pada Populasi Sel Kanker Payudara CD44/CD24

Pada gambar 4.8 diatas diperoleh gambaran bahwa ekspresi gen SOX2 pada subpopulasi sel CD44+/CD24- meningkat pada setiap perlakuan hari mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh dan menurun pada hari ke-14. Pada Gambar 4.9 diperoleh gambaran bahwa ekspresi gen SOX2 pada subpopulasi sel CD44-/CD24- meningkat pada setiap perlakuan hari mulai dari hari pertama hingga hari ketujuh dan menurun pada hari ke-14. Pada Gambar 4.10 diperoleh gambaran bahwa ekspresi gen SOX2 pada populasi sel kanker payudara CD44/CD24 menurun setelah hari ke-3. Pada hari ketiga hingga hari ketujuh terlihat ekspresi SOX2 mulai menurun hingga hari ke-14.

Menilai level ekspresi gen SOX2 tidak dapat hanya mengukur nilai intensitasnya, namun perlu proses normalisasi. Normalisasi merupakan strategi yang dilakukan untuk meminimalisir variasi yang mungkin terjadi, diantaranya penyeragaman jumlah sel yang akan diekstraksi dan penyeragaman jumlah total RNA yang akan digunakan dalam proses RT-PCR. Selain itu, langkah lainnya adalah dengan menggunakan *housekeeping gene* sebagai kontrol dalam (Radonic et al., 2004). *Housekeeping gene* yang digunakan pada penelitian adalah PUM1 dimana ekspresi gen ini telah dipelajari baik pada sel normal maupun sel kanker dan terbukti efektif dalam mengontrol variasi yang terjadi (Gale, 2005). Setelah dinormalisasi dengan PUM1 maka diperoleh tingkat ekspresi gen SOX2 pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11. Kurva Hasil Normalisasi gen SOX2 dan PUM1 pada subpopulasi sel CD44+/CD24-, CD44-/CD24-, dan populasi sel kanker payudara CD44/CD24

Pada kurva normalisasi di atas diperoleh gambaran mengenai tingkat ekspresi gen SOX2 pada sel kanker payudara CD44+/CD24-, CD44-/CD24-, dan CD44/CD24. Pada sel kanker payudara CD44+/CD24- ekspresi gen SOX2 tinggi pada hari ke-3 dan terlihat bahwa ekspresi ini tetap dipertahankan pada hari ke-7. Hal ini dikarenakan *feeder layer* MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) mampu mempertahankan pluripotensi sel, dimana parameternya terlihat pada ekspresi gen SOX2 yang tetap tinggi walaupun cenderung menurun. Menurunnya ekspresi gen SOX2 pada hari ke-14 diperkirakan karena *feeder layer* yang dibentuk oleh MEF sudah tidak mampu lagi memberikan faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan oleh sel untuk tetap berproliferasi dan mempertahankan pluripotensinya. Pertumbuhan sel pada hari ke-14 (Gambar 4.16) terlihat bahwa *feeder layer* MEF sudah lepas dari dasar *well*.

Pada sel kanker payudara CD44-/CD24- ekspresi gen SOX2 tinggi pada hari ke-3 dan terlihat bahwa ekspresi ini menurun pada hari ke-7. Ekspresi SOX2 yang tinggi pada sel bukan punca menandakan bahwa gen ini terekspresi, baik pada sel punca kanker maupun sel non punca kanker payudara. Belum terdapat publikasi yang menyatakan bahwa MEF mampu menginduksi balik sel non punca menjadi sel punca karena kemampuan MEF sebagai *feeder layer* hanya dapat mempertahankan pluripotensi sel sehingga sel tidak terdiferensiasi. Diperkirakan pada proses penyortiran sel, ada sebagian sel punca kanker yang terbawa akibat

terjadinya *overflow* dan sel punca kanker yang terbawa ini memiliki kemampuan proliferasi dan pluripotensi yang tinggi sehingga mempengaruhi tingkat ekspresi dari gen SOX2. Diperlukan pengulangan pada proses penyortiran sel untuk meminimalisir terbawanya sel punca kanker.

Pada sel kanker payudara CD44/CD24 ekspresi gen SOX2 tertinggi pada hari ke-1 dan ekspresinya terus menurun hingga hari ke-14. Hal ini dikarenakan pada sel ini tidak ditumbuhkan dalam MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) sehingga kemampuan pluripotensi sel tidak dipertahankan, yang terlihat pada tingkat ekspresi gen SOX2 yang menurun hingga hari ke-14. Menurunnya ekspresi gen SOX2 akibat sel sudah banyak yang terdiferensiasi. Hal ini dapat dilihat pada gambar pertumbuhan sel (Gambar 4.16) dan terlihat bahwa morfologi sel punca yang bulat dan bergerombol, sebagian sudah berubah menjadi bentuk yang memanjang dan menjalar. Hal ini menggambarkan bahwa sel punca kanker telah terdiferensiasi.

Pada beberapa studi, dinyatakan bahwa SOX2 terekspresi pada berbagai jaringan normal dan kanker. SOX2 berlokasi pada kromosom 3q dan terlokalisasi di nukleus dan sitoplasma. Overekspresi gen ini menunjukkan korelasi dengan fenotip kanker. Ekspresi dari gen ini terdeteksi pada sel kanker payudara dan memiliki kemampuan dalam meningkatkan proliferasi dan tumorigenik kanker payudara. Regulasi SOX2 meningkat pada *cell lines* kanker payudara dan terdeteksi pada semua *cell lines* kanker payudara (Soignier, 2011). Pada penelitian kali ini, dilakukan proses penyortiran pada populasi sel kanker payudara sehingga diperoleh subpopulasi sel punca kanker payudara dan subpopulasi sel non punca kanker payudara. Hasilnya diperoleh tingkat ekspresi gen SOX2 yang tinggi pada subpopulasi termasuk populasi sel kanker payudara tanpa penyortiran. Maka dapat diasumsikan bahwa ekspresi gen SOX2 dapat ditemukan pada sel baik pada subpopulasi sel punca maupun non punca kanker payudara. Hingga saat ini, sel non punca kanker payudara (CD44-/CD24-) belum diketahui termasuk jenis sel apa dan diperkirakan merupakan sel punca yang lain.

Analisis BLASTN dilakukan untuk melihat adanya pengaruh MEF terhadap ekspresi gen SOX2 dan PUM1. Hasilnya diperoleh bahwa terdapat

homologi antara primer SOX2 dan PUM1 manusia dengan susunan nukleotida pada mencit. Diperkirakan MEF memberikan pengaruh pada tingkat ekspresi SOX2 dan PUM1 yaitu dapat menghasilkan amplifikasi pada susunan nukleotida mencit. Untuk menilai potensi reaksi non spesifik pasangan primer SOX2 dan PUM1 terhadap susunan nukleotida gen SOX2 dan PUM1 mencit, dilakukan analisis homologi sekuen primer dengan daerah target amplifikasi (Lampiran 5 dan 6).

Pemeriksaan homologi sekuen primer SOX2 *forward* pada susunan nukleotida mencit (Lampiran 7) memperlihatkan adanya homologi sebanyak 14 basa dari 18 basa sekuen primer SOX2 *forward* sedangkan terhadap sekuen primer SOX2 *reverse* terlihat homologi sebesar 100%. Walaupun demikian, produk amplifikasi tidak dapat dihasilkan karena 4 basa daerah 3' susunan nukleotida mencit tidak homolog sehingga tahap polimerisasi tidak berjalan. Pada pemeriksaan homologi sekuen primer PUM1 *forward*, terlihat homologi sebesar 100% dengan susunan nukleotida pada PUM1 mencit sedangkan pada sekuen primer *reverse*, terdapat homologi sebanyak 16 basa dari 20 basa sekuen penyusun primer. Produk amplifikasi diperkirakan dapat terjadi karena terdapat homologi pada daerah 3' terhadap daerah sekuen primer PUM1, khususnya akibat pembentuk cDNA oleh primer *reverse* PUM1 pada reaksi transkripsi balik. Oleh karena itu, diperlukan rancangan primer yang lebih panjang agar lebih spesifik mentarget daerah SOX2 dan PUM1 manusia atau mencari daerah target dimana homologinya rendah.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

1. Ekspresi SOX2 ditemukan pada semua subpopulasi sel kanker payudara.
2. Level ekspresi SOX2 tertinggi ditemukan pada subpopulasi sel punca kanker (CD44+/CD24-) yang diperoleh pada hari ketiga, demikian pula pada subpopulasi sel non punca kanker (CD44-/CD24-), sedangkan pada populasi sel kanker (CD44/CD24) diperoleh pada hari pertama.
3. Antara subpopulasi sel punca kanker dan sel non punca kanker payudara dari sampel CS14 kanker ditemukan level ekspresi SOX2 yang tidak berbeda.

5.2. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi gen pluripotensi yang lain pada ko-kultur sel punca kanker payudara dengan MEF untuk menilai pluripotensi sel punca kanker payudara.
2. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut mengenai jenis sel dari subpopulasi CD44-/CD24-.
3. Perlu evaluasi kondisi PCR untuk menilai spesifisitas reaksi PCR terhadap SOX2 dan PUM1 manusia dan tidak mentarget gen-gen tersebut pada mencit, dengan mengoptimasi kondisi RT-PCR serta membuat rancangan primer yang lebih panjang agar lebih spesifik mentarget daerah SOX2 dan PUM1 manusia.
4. Perlu dilakukan pengukuran level RNA secara kuantitatif dengan menggunakan Real Time RT-PCR untuk mengetahui ekspresi gen yang lebih akurat.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. (2010). Kanker Payudara Dominan di Indonesia. Available at: <http://matanews.com/2010/02/04/kanker-payudara-dominan-di-indonesia/>. 1 Januari 2011.
- Alberts, B., Alexander, J., Julian, L., Martin, R., Keith, R., Peter, W. (2008). *Molecular biology of the cell* (Ed. ke-5). New York: Garland Publishing, Inc.
- Al-Hajj, M., Wicha, Max S., Benito-Hernandez, Adalberto., Morrison, Sean J., dan Clarke, Michael F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 3983-3988.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Laevsky, R., Coleman, R., Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layer for human embryonic stem cell. *Biology of Reproduction*, 68, 2150-2156.
- Applied Biosystem. (2002). *Automated DNA sequencing: chemistry guide*. Foster City: Applied Biosystem Corporation.
- Ausubel, F.M. (2001). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Ausubel, M., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M., Seidman, J.G., John, A.S., Kevin, S. (2003). *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Azamris, Arif, Wirnsma, Darwin, Eriyati. (2003). Ekspresi CD44 pada jaringan tumor karsinoma payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*, 139, 27-31.
- Bapat, S., Anne, C., Michael, D., Kenneth, N., Suraiya, R. (2008). Cancer Stem Cells: similarities and variations in the theme of normal stem cells. *Cancer Stem Cell*. United States: Wiley Publication.
- Bellanti, J. A. (1993). *Imunologi III* (A. Samik Wahab, Penerjemah). Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 173-179.
- Bolodeoku, J. (n. d.). PCR analysis of CD44 variant in tumor. *Methods in Molecular Medicine*, 16, 189.
- Boyer, R. (2000). *Modern experimental biochemistry*. California: Addison Wesley.

- Brown, T.A. (1999). *Genomes*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 20-43.
- Brown, T.A. (2006). *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. (Ed. ke-5). Oxford: Blackwell Publishing, 37-78, 207.
- 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. dan Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantification real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Techniques*, 15, 3, 155-166.
- Chan, K. dan Morris, G.J. (2006). Chemoprevention of breast cancer for women at high risk. *Semin Oncol*. 33, 642-646.
- Chen, Y., Lei, S., Lirong, Z., Ruifang, L., Jing, L., Wenhua, Y., Luyang, S., Xiaohan, Y., Yan, W., Yu, Z., dan Yongfeng, S. (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J. Bio. Chem*, 283, 26, 17969–17978.
- Comtesse, N., Zippel, A., Walle, S., Monz, D., Backes, C., Fischer, U., Mayer, J., Ludwig, N., Hildebrandt, A., Keller, A., Steudel, W., Lenhof, H., dan Meese, E. (2005). Complex humoral immune response against a benign tumor: frequent antibody response against specific antigens as diagnostic targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 9601–9606.
- Dean, M. (2008). Cancer stem cell and new therapeutic approaches. *Dalam S. Bapat* (Ed.). *Cancer Stem Cell*. United States: Wiley Publication.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2007). *Profil kesehatan Indonesia 2005*. Jakarta: Depkes RI, 52.
- Dick, J. E. (2003). Breast cancer stem cell revealed. *PNAS*, 100, 3547-3549.
- Dimri, G., Band, H., dan Band, V. (2005). Mammary epithelium cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Research*, 7, 171-179.
- Djoerban, Z. (2011). Kanker Payudara di Indonesia. Available at: <http://ykpjabar.org/index.php/artikel/49-wanita/49kankerpayudara-di-indonesia>. 1 Januari 2011.

- Dong, C., Wilhelm, D., Koopman, P. (2004). Sox Gene and Cancer. *Cytogenet Genome Res*, 105, 442-447.
- Dulbecco, R. dan Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8, 396.
- Erlich, H.A. (1989). *PCR Technology: principles and applications for DNA Amplification*. England: Macmillan Publishers Ltd.
- Farrell, R.E. (2010). *RNA Methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization*. New York: Elsevier Academic Press.
- Fariied, A. (2006). *Cancer, stem cells, and cancer stem cells*. Japan: Gunma University.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., Bray, F., dan Pisani, P. (2002). *Globocan 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Vertion 2.0*. Lyon: IARC Press.
- Fillmore, C. dan Kuperwasser, C. (2007). Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man. *Breast Cancer Res*. 9, 3, 303.
- Franks, F. (1999). *Protein Biotechnology*. US: The Humana Press Inc.
- Gale, T. (2005). Housekeeping Genes. *Dalam: Gale, Thomas. World of Genetics*. US: Thomas Corporation.
- Gardner, R.L. (2007). Stem Cells and Regenerative Medicine: principles, prospects and problems. *C R Biol*, 330, 465-473.
- Gil, J., Stembalska, A., Pesz, K.A., dan Sasiadek, M.M. (2008). Cancer Stem Cells: the theory and perspectives in cancer therapy. *J App Genet*, 29, 193-199.
- 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., Stockert, E., Scanlan, M.J., Keresztes, R.S., jager, D., Altorki, N.K., Old, L.J., dan Chen, Y. (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.
- Grimshaw, M. J., Lucienne, C., Konstantinos, P., Julia, A.C., Herman, R.B., Laura, C., Joyce, T., dan Joy, M.B. (2008). Mammosphere culture of

- metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Research*, 10:R52.
- Hall, T.A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* [Computer Software]. USA : Isis Pharmaceuticals.
- Hall, B.E. (2001). *Phylogenetic trees made easy: A how to manual for molecular biologists*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Haryana, S.M., dan Soesatyo, M. (1995). Aspek Genetik dan Immunologik Kanker Payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*, 99, 52-55.
- Herschkowitz, J. I. (2010). *Breast Cancer Stem Cell: initiating a new sort of thinking*. The Company of Biologist Ltd.
- Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S. dan Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 1–6.
- Hukom, R.A. (2003). Risiko kanker payudara ditinjau dari segi epidemiologi. *Penatalaksanaan Kanker Payudara Terkini*. Jakarta: Pustaka Populer Obor.
- Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia. (n.d). Material and methods: culture cells. Jakarta: IHVCB-UI. 1-6.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., dan Thun, M. (2002). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 52, 23-47.
- Jung, B. L., Ji, MS., Jeong, E.L., Jong, H.P., Sun, J.K., Soo, M.K., Ji, N.K., Moon, K.K., Sung, I.R., Hyun, S.Y. (2004). Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*, 126, 727-735.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., dan Kondoh, H. (2000). Pairing SOX Off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, 16, 182-187.
- Kardinah. (2003). Pemeriksaan radiodiagnostik pada kanker payudara dini. *penatalaksanaan kanker payudara terkini*. Jakarta: Pustaka Populer Obor.
- Klug, W.S. dan Cummings, M.R. (1994). *Concepts of genetics*. (Ed. ke-4). New Jersey: MacMillan Publishing Company, 402.

- Kopans, D. B. (2007). Breast Anatomy and basic Histology, Physiology, and Pathology. *Breast Imaging*. Philadelphia: Lippincott Williams dan Wilkins.
- Kopp, J. L., Brina, D.O., Michelle, D., Angie, R. (2008). Small increases in the level of SOX2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 903-911.
- Larkin, M. A., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0 [Computer Software]. UK : The Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., Wong, H., Rosen, J., dan Chang, J.C. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst*, 100, 672-679.
- Lodge, J., Lund, P.A, dan Minchin, S. (2007). *Gene cloning : principles and application*. Abingdon: Taylor & Francis Group, 61.
- Lyng, M.B., Laenkholm, A.V., Pallisgaard, N., dan Ditzel, H.J. (2008). Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC Cancer*, 8, 20.
- Manchura, K., dan Missel, A. (2003). Higher sensitivity & specificity using the Qiagen one step RT-PCR kit. 1 hlm. Mei 14, 2011. [http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weekly article.html](http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/weekly%20article.html).
- 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.
- Menopause Symptoms, the Anatomy of the Breast*. (n.d). Januari 26, 2011. <http://www.34-menopause-symptoms.com/breast-pain-about.htm>.
- Mei, Z. dan Rosen, J.M. (2006). Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 16, 60-64.
- Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy. (2008). *Breast Disorders: Cancer*. US: Merck & Co. Inc.

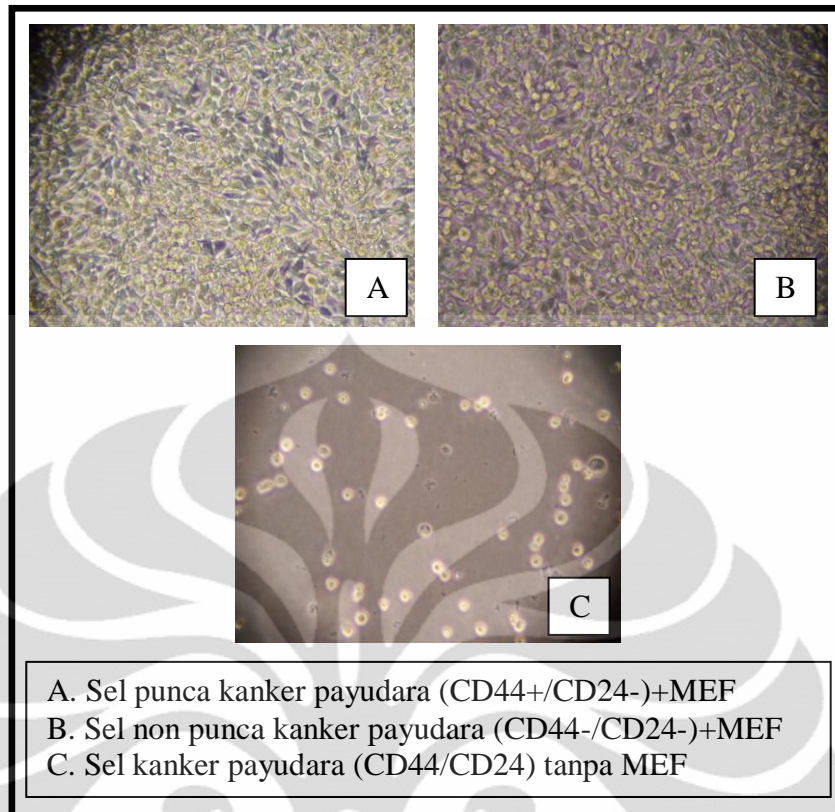
- Motari, E., Xincheng, Z., Xiaosan, S., Yang, L., Mamuka, K., Michael, F., dan Peng, G.W. (2009). Analysis of recombinant CD24 glycans by MALDI-TOF-MS reveals prevalence of sialyl-T antigen. *American Journal of Biomedical Science*, 1, 1-11.
- Nagaoka, M. (2008). Design of the artificial acellular feeder layer for efficient propagation of mouse embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 26468-26476.
- NanoDrop 2000 spectrophotometer user's manual*. (2009). Delaware: Thermo Fisher Scientific.
- National Center of Biotechnology Information. (2011). SOX2 SRY (sex determining region Y)-box 2 (*Homo sapiens*). Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657. 22 April 2011.
- National Center of Biotechnology Information. (2011). PUM1 pumilio homolog 1 (*Drosophila*). Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698. 22 April 2011.
- Ornela, A. (2010). *Pengukuran level RNA gen penanda sel punca kanker payudara dari kultur sel primer jaringan kanker payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA-UI.
- Ponti, D., Aurora, C., Nadis, Z., Graziella, P., Giovanna, P., Danila, C., Silvana, P., Marco, A.P., Maria, G.D. (2005). Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65, 5506-5511.
- Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook*. (2006). US: Qiagen Group.
- QIAquick® Spin Handbook*. (2002). Singapura: Qiagen Distributor.
- Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh*. (2006). California: Biorad Laboratories, Inc.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I.M., Landt, O., Siegert, W., dan Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 313, 856–862.

- Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L., dan Peyrat, J.P. (2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J. Cancer*, 36, 1038-1042.
- Reye, T., Morrison, Sean J., Clarke, Michael F., dan Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111.
- RNeasy Mini Handbook*. (2006). US: Qiagen Group.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., dan Rhoads, R.E.. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acid Research*, 18(21), 6409-6412.
- Rodda, D.J. (2005). Transcriptional regulation of NANOG by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem*, 24731-24737.
- Rodriguez-Pinilla, S.M., Daavid, S., Gema, M., Yolanda R., Miguel, A.M., Lucia, H., David, H., Jorge, S.R, dan Jose, P. (2007). SOX2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Modern Pathol*, 20, 1006-1012.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Ed. ke-2). NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. dan Russel, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual volume 1*. (Ed. ke-3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saputra, V. (2006). Dasar-dasar stem cell dan potensi aplikasinya dalam Ilmu kedokteran. Jakarta: *Cermin Dunia Kedokteran*, 153, 21-25.
- Saxena, M. dan Rangarajan, A. (2008). Isolation and characterization of breast and brain cancer stem cells. *Cancer Stem Cell*. United States: Wiley Publication. 57-58.
- Seidman, L.A. dan Moore, C.J. (2000). *Basic laboratory for biotechnology: textbook and laboratory reference*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc, 582-583.
- Seidman, L. dan Mowery, J. (2006). UV spectrophotometry of DNA, RNA, and proteins. http://matcmadison.edu/biotech/resources/methods/labManual/unit_4/exercise_15.htm. 28 Maret 2011.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., dan Till, J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J. Cell. Physiol*. 62, 327-336.

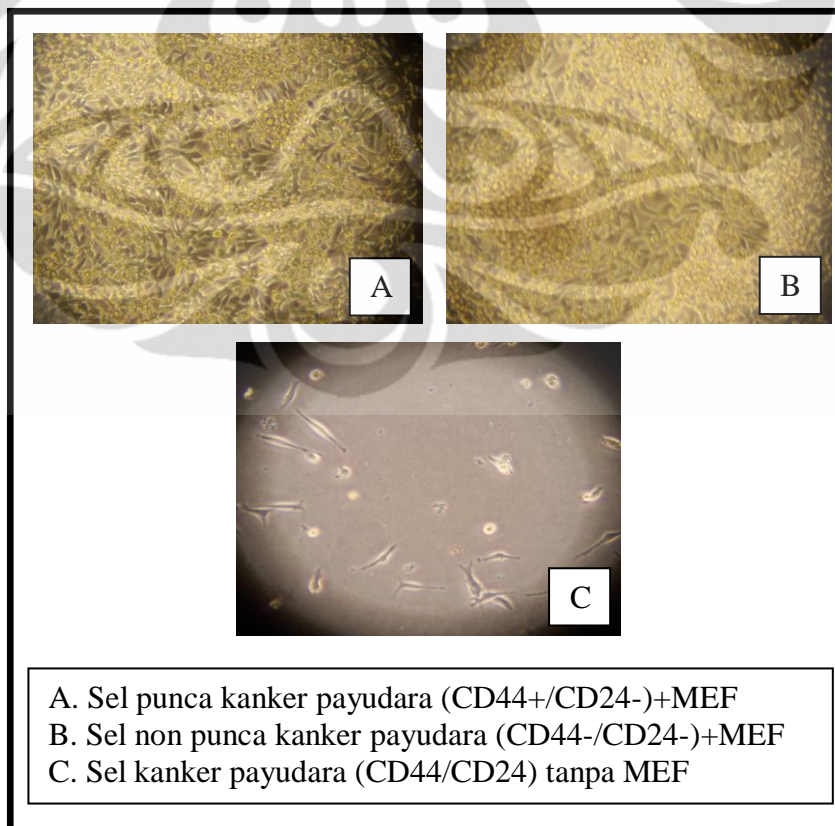
- Soignier, Y. M. (2011). Oct3 and Sox2 expression in mammary carcinoma cells. *ProQuest LLC*.
- Song, L.L. dan Miele, L. (2007). Cancer stem cell-an old idea that's new again: Implication for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 7, 431-438.
- Sudiana, I. K. (2008). *Patobiologi Molekuler Kanker*. Jakarta: Salemba Medika. 27-89.
- Szabo, Aniko., Perou, Charles M., Karaca, Mehmet., Perreard, Laurent., Quackenbush, John F., Bernard, dan Philip, S. (2004). Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology* 2004, 5:R59.
- Takahashi, K. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131, 5, 861-872.
- Talaro, K.P. dan Talaro, A. (2002). *Foundation in microbiology*. (Ed. ke-4). Boston: McGraw Hill Companies, 292.
- The National Academies. (n.d.). *Understanding stem cells*. <http://www.national-academies.org> . 29 Desember 2010.
- Thomson, J.A., Joseph, I., Sander, S.S., Michelle, A.W., Jennifer, J.S., Vivienne, S.M., dan Jeffrey, M.J. (1998). Embrionic stem cell derived from human blastosysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Trichopoulos, D., Lipworth, L., Petridou, E., Adami, H.O. (1997). *Cancer: principle and practice of ncology*. (Ed.ke-5). 231-257.
- Vandesompele, J., Katleen, D.P, Filip, P., Bruce, P., Nadine, V.R., Anne, D.P., dan Frank, S. (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.
- Vodopich, D.S. dan Moore, R. (2005). *Biology: Laboratory manual*. (Ed.ke-7). Boston McGraw-Hill Companies, 67.
- Walsh, G. (2007). *Pharmaceutical biotechnology concepts and applications*. West Sussex: John Wiley dan Sons.
- 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.
- Wilson, M. dan Koopman, P. (2002). Matching SOX: Partner proteins and cofactors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 12, 441-446.
- Wong, D.W. (2006). *The ABSs of gene cloning*. (Ed. ke-2). New York: Springer Science+Business Media, Inc. 85, 131-132, 211-213.
- Wolfe, S.L. (1995). *An introduction to cellular and molecular biology*. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 420-424.
- Wright, M. H., Anna, M.C., Crystal, D.S., Marisa, D.C., Suresh, V.A, dan Lyuba, V. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD 133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res*, 10, 1, R10.
- Yan, S., Caroline D., Jeong, T.D., Heung, S.H., Hans, R.S., dan Sheng, D. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3, 568–574.
- Zippelius, A., Lutterbuse, R., Riethmuller, G. dan Pantel, K. (2000). Analytical variables of reverse transcription-polymerase chain reaction-based detection of disseminated prostate cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 6, 2741-2750.

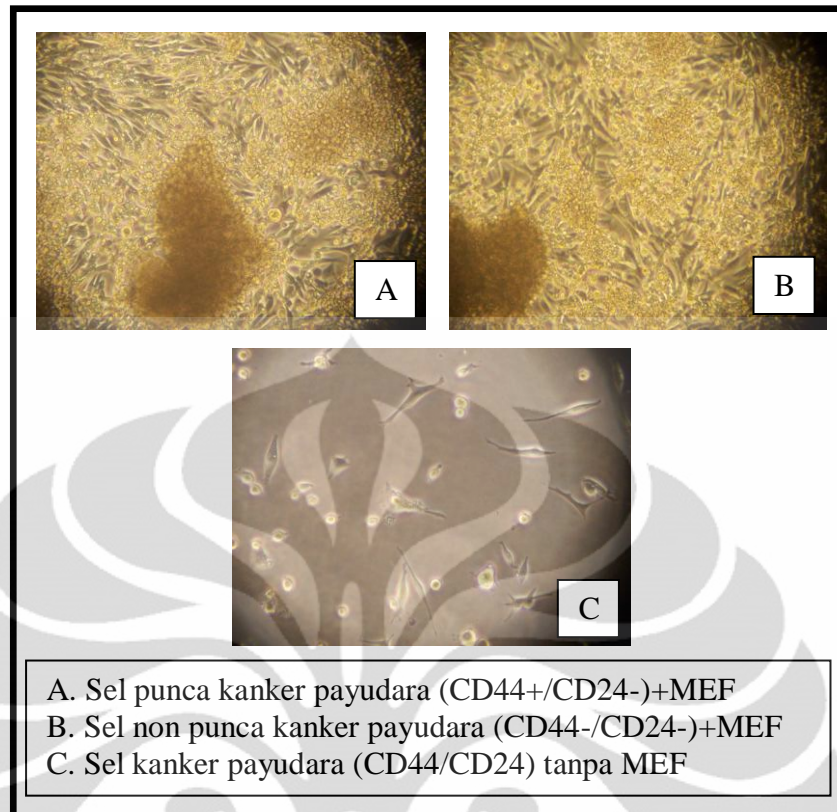




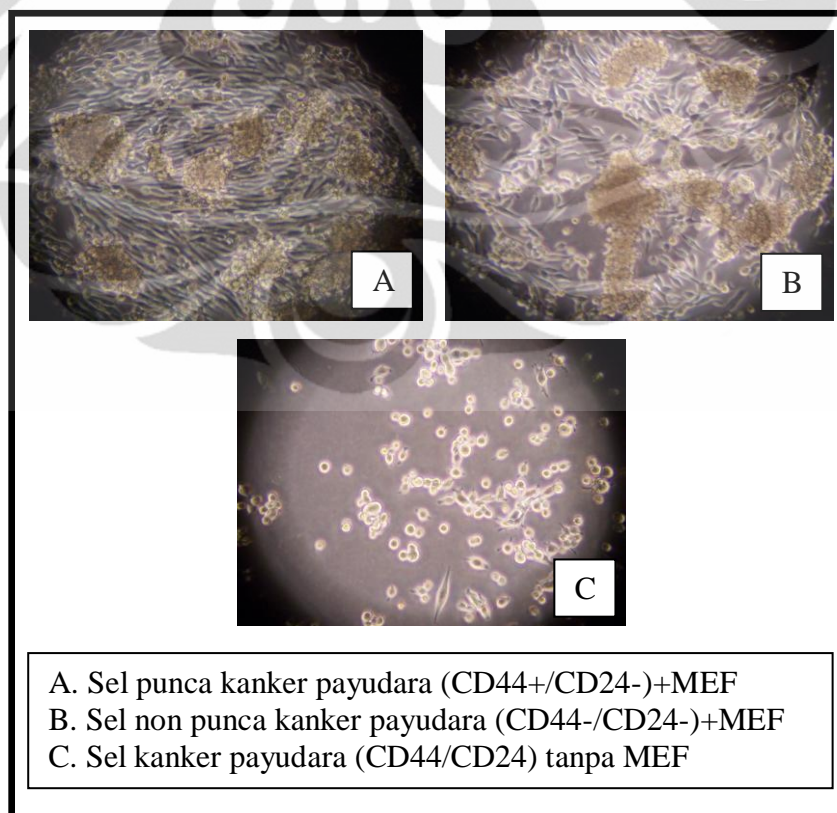
Gambar 4.12. Pertumbuhan sel setelah ditanam dalam DMEM/F12



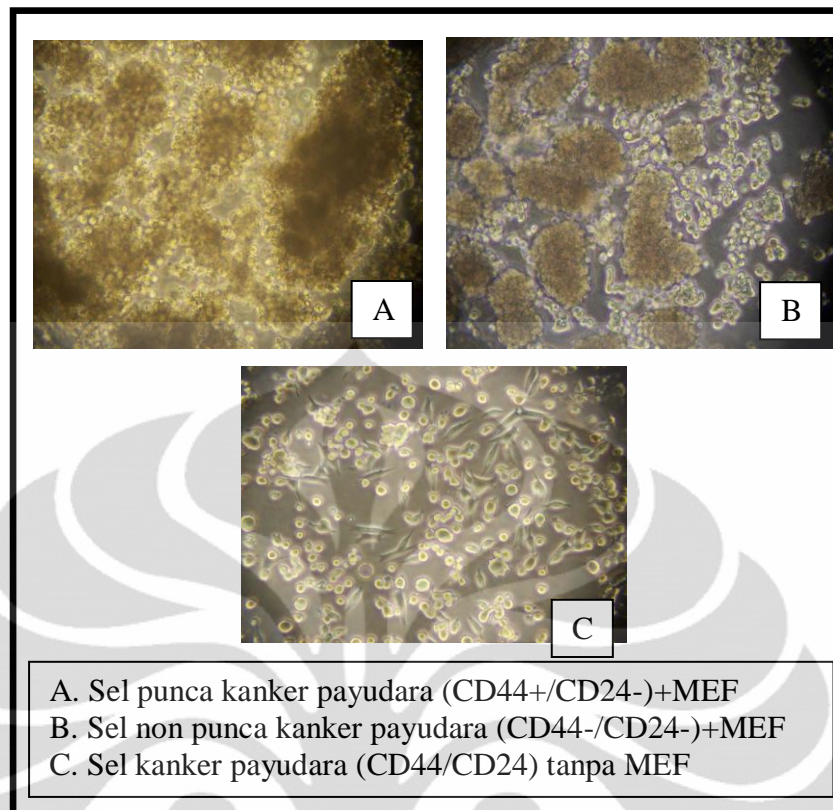
Gambar 4.13. Pertumbuhan sel hari pertama dalam DMEM/F12



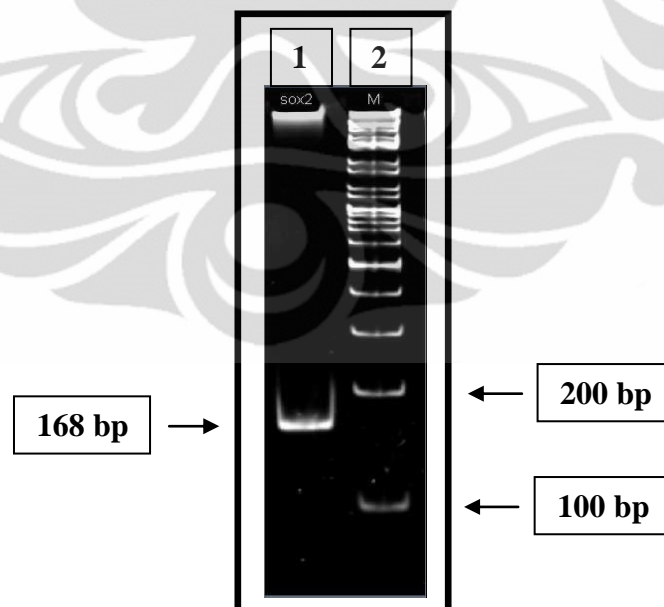
Gambar 4.14. Pertumbuhan sel hari ketiga dalam DMEM/F12



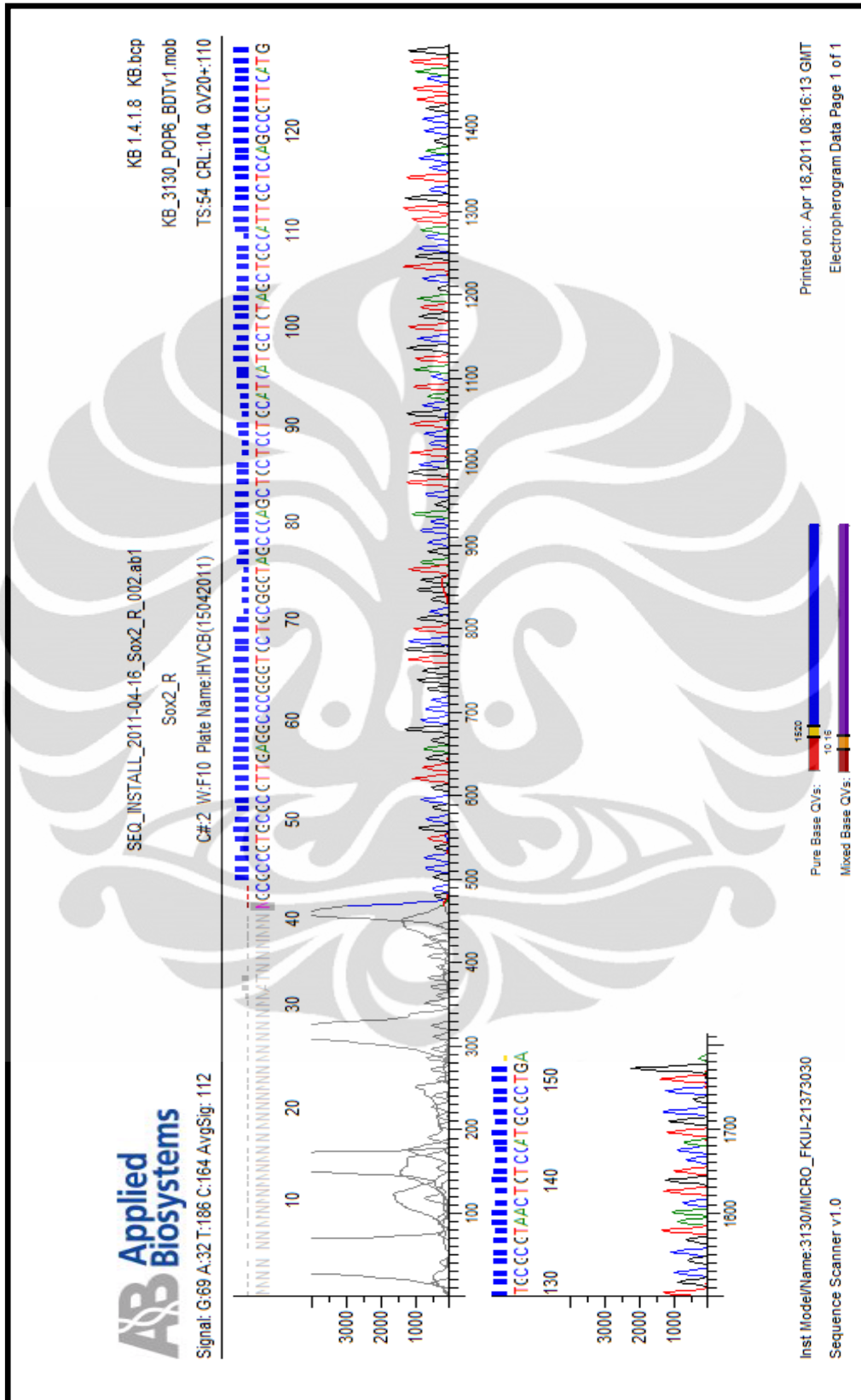
Gambar 4.15. Pertumbuhan sel hari ketujuh dalam DMEM/F12



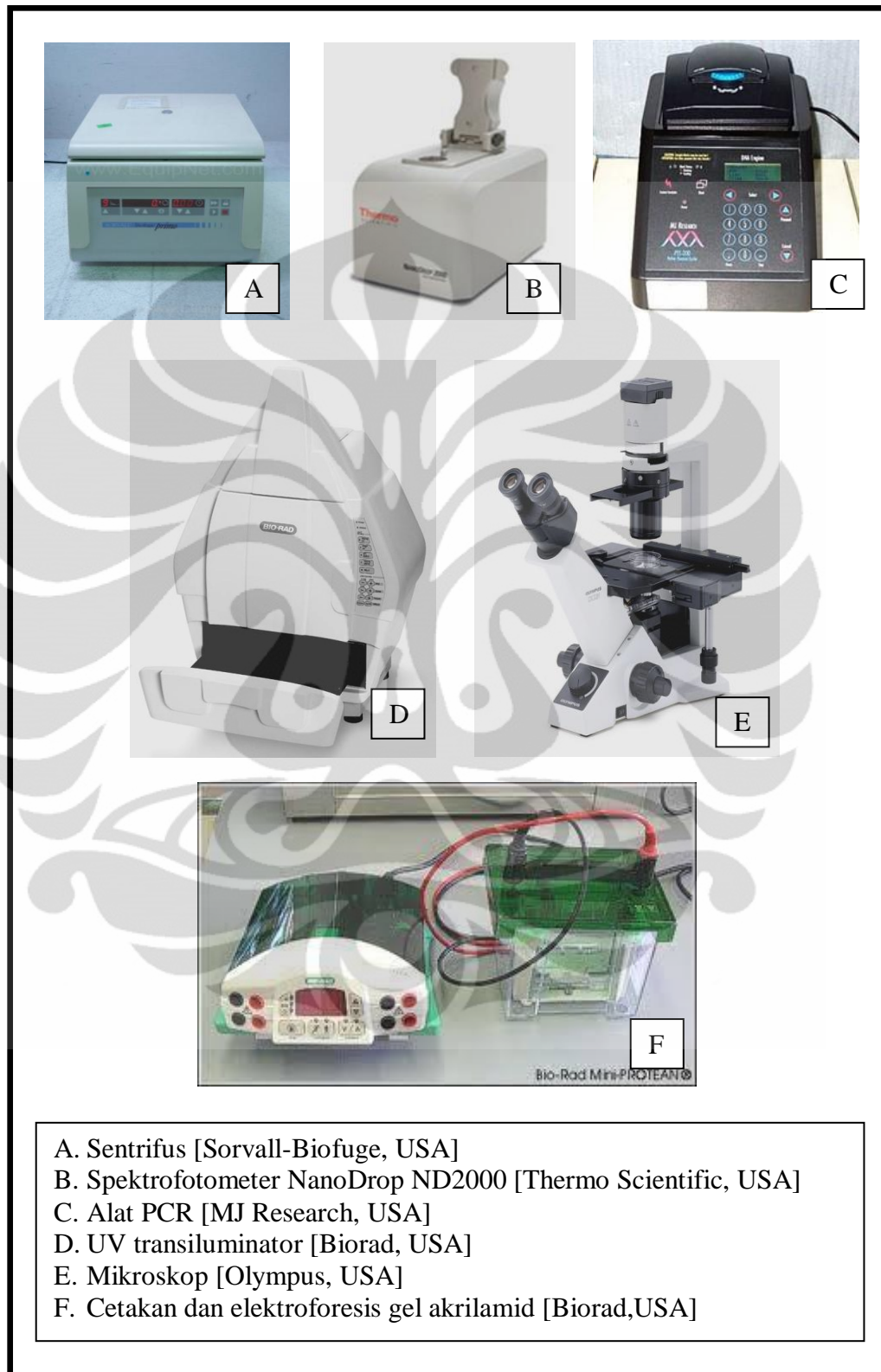
Gambar 4.16. Pertumbuhan sel hari keempat belas dalam DMEM/F12



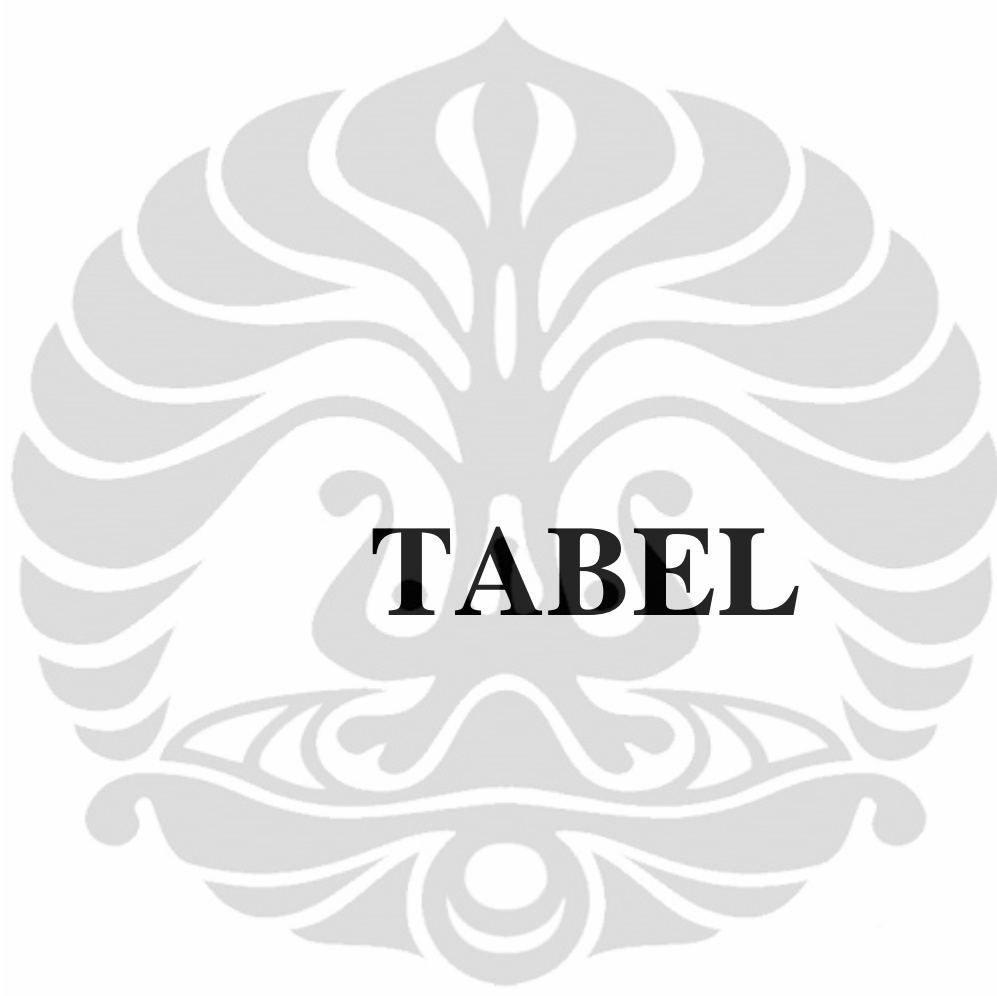
Gambar 4.17. Hasil pufifikasi produk PCR untuk *sequencing* SOX2 pada gel poliakrilamid 8%: 1. Marker Gene Ruler 100bp; 2. SOX2 suhu 58⁰C.



Gambar 4.19. Hasil elektroforegram sequencing gen SOX2



Gambar 4.20. Gambar Alat yang Digunakan dalam Penelitian



Tabel 3.1. Urutan Basa Primer untuk RT-PCR

No	Nama Primer dan Komposisi Basa	Jumlah Nukleotida	Suhu Leleh (°C)	% GC	Mulai	Berhenti
1	SOX2 F (NM_003106.3) 5'-CAGCGCATGGA CAGTTAC-3'	18	50,69	55,56	900	917
	SOX2 R 5'-CATGGAGTTGTA CTGCAGG-3' Panjang amplikon 168	19	49,94	52,63	1067	1049
2	PUM1 F (NM_001020658.1) 5'-TGAGGTGTGCA CCATGAA C-3'	19	52,23	52,63	3416	3434
	PUM1 R 5'-CAGAAATGTGCT TGCCATAG G-3' Panjang amplikon 187	20	51,13	50,00	3602	3583

Tabel 4.1. Hasil Perhitungan Jumlah Sel pada Setiap Perlakuan Hari

Sumur (well)	Hari ke-1 (sel/ml)	Hari ke-3 (sel/ml)	Hari ke-7 (sel/ml)	Hari ke-14 (sel/ml)
I	2.650.000	825.000	1.275.000	712.500
II	1.725.000	725.000	1.400.000	1.425.000
III	225.000	175.000	150.000	700.000
Penyeragaman	225.000	175.000	150.000	700.000

Tabel 4.2. Hasil Perhitungan Konsentrasi pada Setiap Perlakuan Hari

Ekstraksi hari	Sumur	Konsentrasi RNA	A 260	A 280	A260/280
Pertama	I	11,9	0,297	0,275	1,08
		11,8	0,295	0,291	1,01
		12,1	0,303	0,282	1,07
	II	10,2	0,256	0,262	0,98
		10,3	0,258	0,290	0,89
		10,4	0,260	0,283	0,92
	III	4,3	0,108	0,181	0,60
		4,4	0,111	0,182	0,60
		5,0	0,124	0,194	0,64
Ketiga	I	15,8	0,396	0,228	1,73
		16,3	0,408	0,236	1,73
		16,3	0,407	0,246	1,65
		17,3	0,433	0,248	1,75
	II	16,9	0,423	0,237	1,79
		17,1	0,427	0,253	1,69
	III	4,2	0,104	0,076	1,37
		3,9	0,077	0,061	1,31
		4,1	0,090	0,058	1,46
Ketujuh	I	11,5	0,288	0,197	1,46
		11,3	0,282	0,188	1,50
		11,6	0,289	0,195	1,48
		13,2	0,331	0,219	1,51
	II	13,0	0,324	0,215	1,50
		13,5	0,337	0,229	1,47
	III	9,8	0,244	0,163	1,50
		9,2	0,230	0,152	1,51
		9,5	0,237	0,163	1,45
Keempat belas	I	309,7	7,743	3,717	2,08
		309,0	7,726	3,669	2,09
		307,0	7,675	3,685	2,08
	II	163,7	4,093	1,999	2,05
		164,1	4,102	1,988	2,06
		163,7	4,092	1,995	2,05
	III	81,5	2,038	1,025	1,99
		82,2	2,056	1,026	2,00
		81,8	2,045	1,045	2,01

Tabel 4.3. Komposisi dan Perhitungan Larutan yang Digunakan pada Proses RT-PCR

No	Komposisi	Volume	Konsentrasi akhir
1	Air bebas nuklease	1,65 ul	-
2	5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer	2 ul	1x
3	Q-Solution	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 (40 unit/ul)	0,1 ul	-
9	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,4 ul	-
10	RNA cetakan	2 ul	0,6 ng/ul
Volume akhir		10 ul	

[Sumber: OneStep RT-PCR (Qiagen, 2008)]

Tabel 4.4. Pengukuran Intensitas Optimasi SOX2 dan PUM1

No	Gen	Suhu (°C)	Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel)	Intensitas Puncak (Pixel)	Luas Pita Rata-rata (Int x mm)
1.	SOX2	55	3323,500	2565,938	9493,968
		57,2	4094,000	3248,729	14629,281
		58,8	4094,000	3070,120	19034,743
		60,0	4094,000	2951,824	17415,762
2.	PUM1	55	3835,438	2826,598	4522,556
		57,2	2977,000	1725,302	3968,193
		58,8	1970,438	1684,737	3201,000
		60	2708,000	1794,452	3050,568

Tabel 4.5. Hasil Uji Linearitas SOX2 dan PUM1

Gen	Konsentrasi (ng/ μ l)	Hasil Pengukuran Intensitas (Pixel)
SOX2	2	2169,06
	4	2707,13
	6	3140,81
PUM1	2	1403,75
	4	1627,00
	6	2020,31
K (-)	-	1347,00

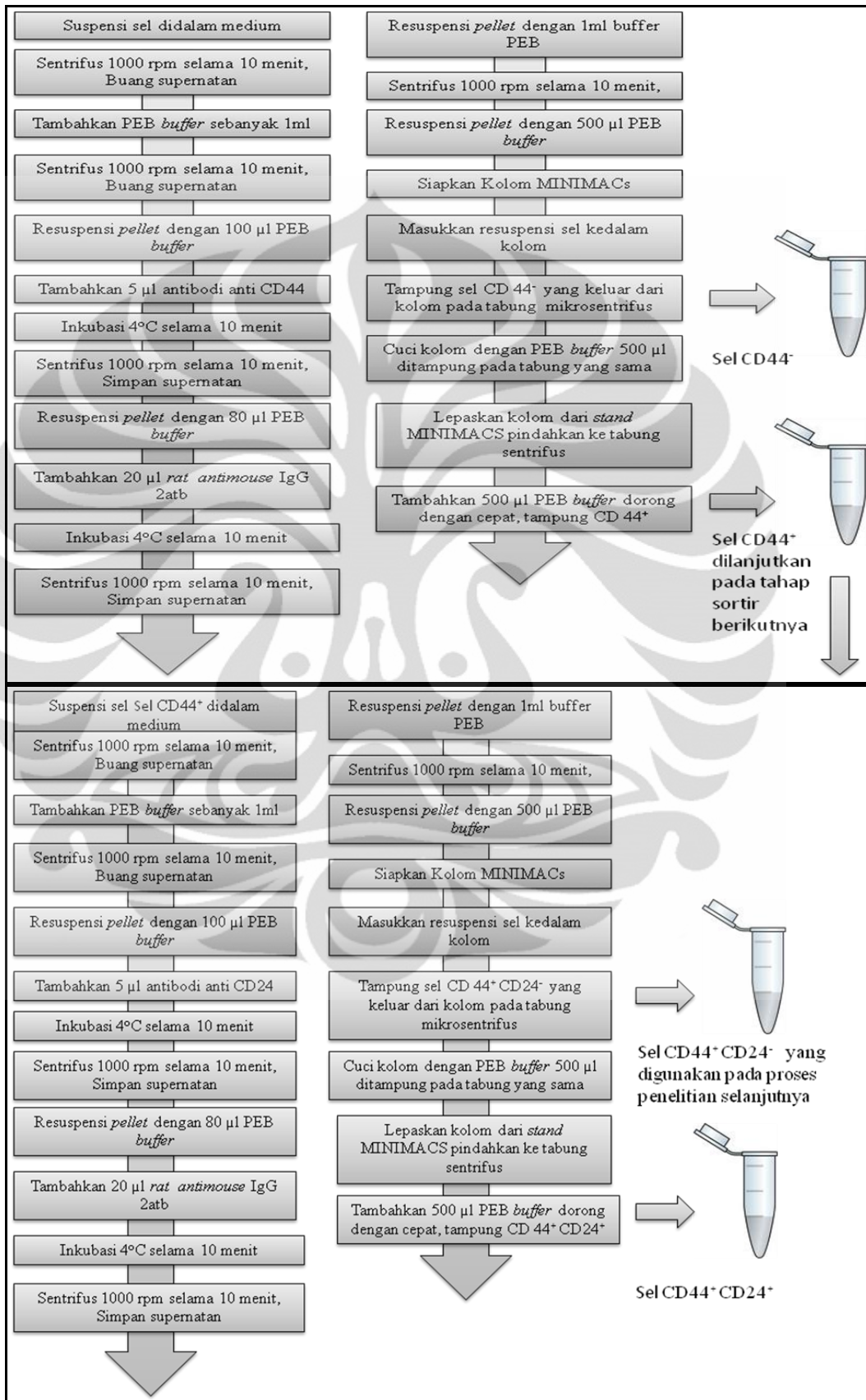
Tabel 4.6. Pengukuran Intensitas Tingkat Ekspresi Gen SOX2 dan PUM1

Hari ke-	Sumur (<i>well</i>)	Hasil Pengukuran Intensitas SOX2 (Pixel)	Hasil Prngukuran Intensitas PUM1 (Pixel)
1	I	715,18	325,90
	II	801,93	306,17
	III	914,25	612,48
3	I	1018,50	900,80
	II	1050,81	331,13
	III	1068,25	325,34
7	I	1074,56	650,10
	II	1134,43	499,97
	III	952,75	418,05
14	I	508,06	777,08
	II	662,56	366,21
	III	641,68	306,27

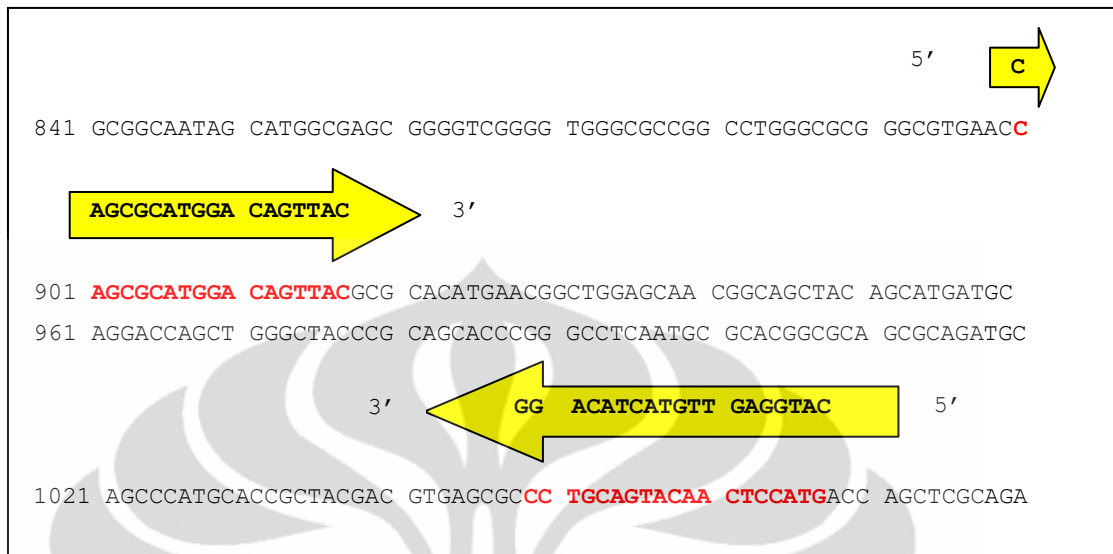


LAMPIRAN

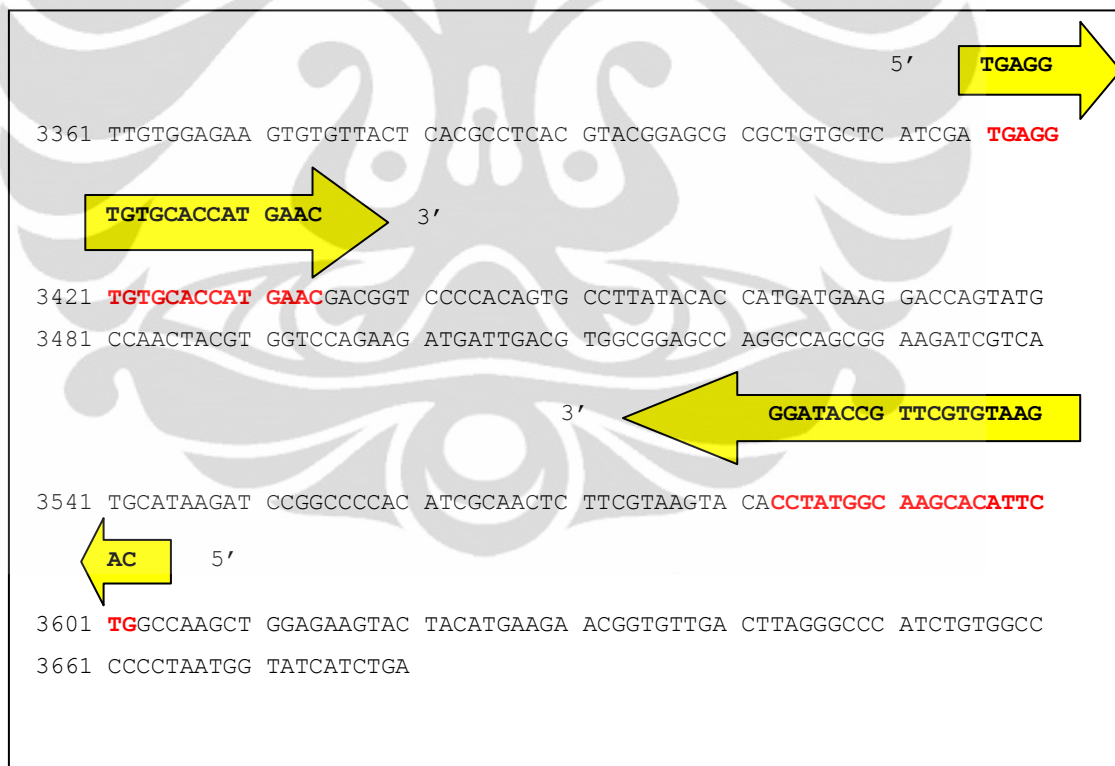
Lampiran 1. Skema proses sortir sel dengan MINIMACs *cells separator*



Lampiran 2. Posisi desain primer SOX2 pada susunan nukleotida manusia



Lampiran 3. Posisi desain primer PUM1 pada susunan nukleotida manusia



Lampiran 4. Pemeriksaan BLASTN SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida manusia

Accession: NM_003106.3

SOX2 forward

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
```

SOX2 reverse

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
```

Accession: NM_001020658.1

PUM1 forward

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2e-07
Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Plus

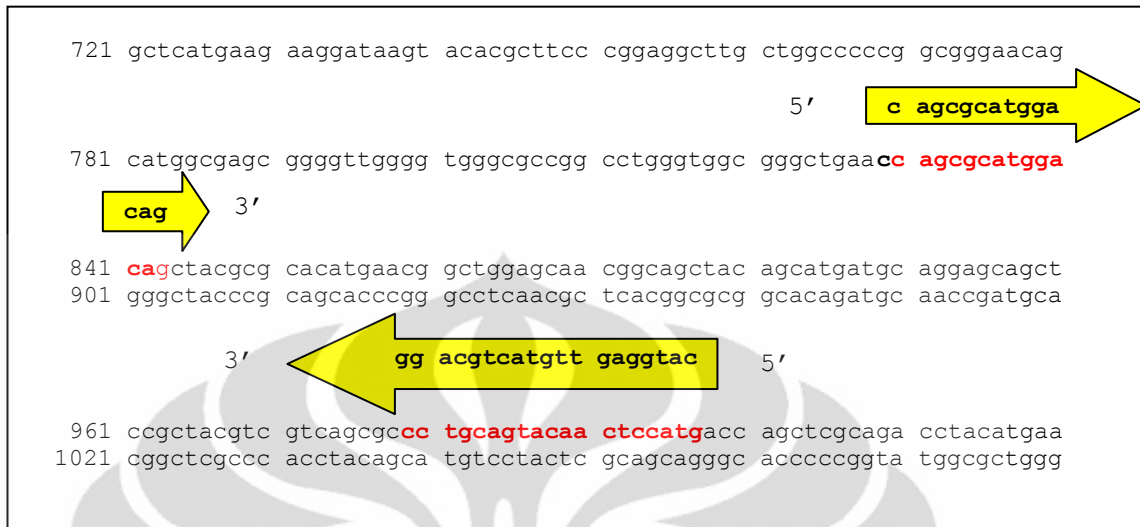
```
Query 1      TGAGGTGTGCACCATGAAC 19
            |||
Sbjct 3416    TGAGGTGTGCACCATGAAC 3434
```

PUM1 reverse

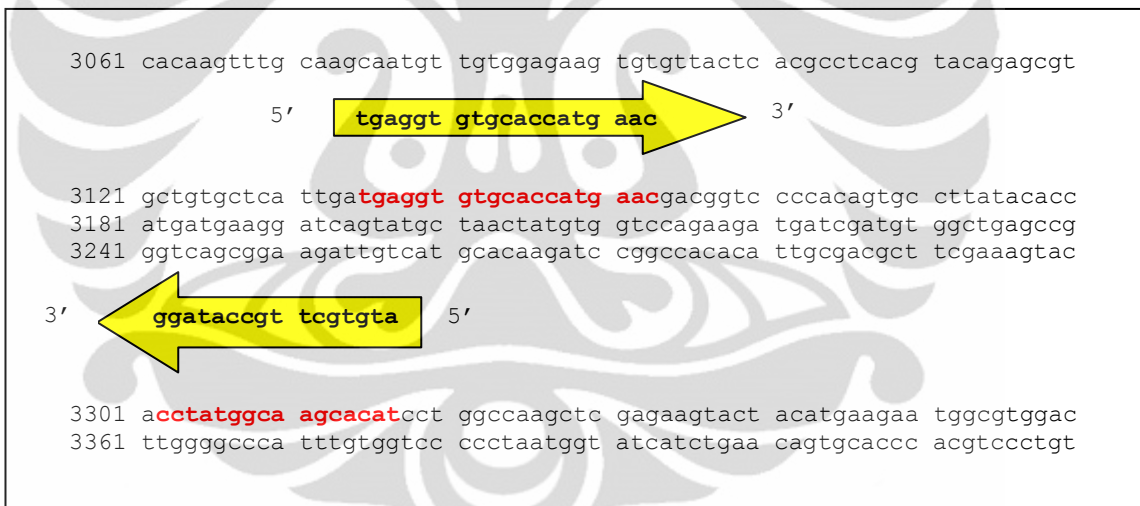
Score = 40.1 bits (20), Expect = 5e-08
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CAGAATGTGCTTGCCATAGG 20
            |||
Sbjct 3602    CAGAATGTGCTTGCCATAGG 3583
```

Lampiran 5. Posisi desain primer SOX2 pada susunan nukleotida menci



Lampiran 6. Posisi desain primer PUM1 pada susunan nukleotida menci



Lampiran 7. Pemeriksaan BLASTN SOX2 dan PUM1 pada susunan nukleotida mencit

Mus musculus high mobility group box protein (SOX2) mRNA, complete cds.
Accession : U31967

SOX2 forward

Score = 28.2 bits (14), Expect = 8e-05
Identities = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   CAGCGCATGGACAG 14
          |||
Sbjct 830 CAGCGCATGGACAG 843
```

SOX2 reverse

Score = 38.2 bits (19), Expect = 9e-08
Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 1   CATGGAGTTGTACTGCAGG 19
          |||
Sbjct 997 CATGGAGTTGTACTGCAGG 979
```

Mus musculus pumilio 1 (Drosophila) (Pum1), transcript variant 4, mRNA
Accession : NM_001159605.1

PUM1 forward

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2e-07
Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1   TGAGGTGTGCACCATGAAC 19
          |||
Sbjct 3135 TGAGGTGTGCACCATGAAC 3153
```

PUM1 reverse

Score = 32.2 bits (16), Expect = 1e-05
Identities = 16/16 (100%), Gaps = 0/16 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 5   ATGTGCTTGCCATAGG 20
          |||
Sbjct 3317 ATGTGCTTGCCATAGG 3302
```


Lampiran 8. Hasil analisis BLASTN sekuen SOX2

Accession	Description	Max Score	Total Score	Query Coverage	E Value	Max Ident
NT_005612.16	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37.p2 reference primary assembly; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	178	178	100%	1e-42	96%
NW_001838884.2	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, alternate assembly HuRef SCAF_1103279188385, whole genome shotgun sequence; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	178	178	100%	1e-42	96%
NW_921807.1	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, alternate assembly Hs_Celera 211000035664, whole genome shotgun sequence; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	178	178	100%	1e-42	96%
NT_005612.16	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37.p2 reference primary assembly; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	187	187	99%	2e-45	97%
NW_001838884.2	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig alternate assembly HuRef SCAF_1103279188385, whole genome shotgun sequence; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	187	187	99%	2e-45	97%
NW_921807.1	Homo sapiens chromosome 3 genomic contig alternate assembly Hs_Celera 211000035664, whole genome shotgun sequence; this part of subject sequence transcription factor SOX-2	187	187	99%	2e-45	97%

Lampiran 9. Hasil *alignment* sekuen SOX2Sekuen *Forward*

```

>ref|NT_005612.16| Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37.p2
reference primary assembly, Length=100537107
this part of subject sequence:transcription factor SOX-2
Score = 178 bits (96), Expect = 1e-42
Identities = 104/108 (96%), Gaps = 0/108 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 60
CAGGAGCAGCTGGGCTACCCGAGCACCCGGGCCTCAACGCGCACGGCGCGGCAGATG
||||| |||||||
CAGGACCAGCTGGGCTACCCGAGCACCCGGGCCTCAATGCGCACGGCGCAGCGCAGATG
Sbjct 87925817 87925876

Query 61 108
CAGCCCATGCACCGCTACGACGTCAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATG
||||| |||||||
CAGCCCATGCACCGCTACGACGTCAGCGCCCTGCAGTACAACCTCCATG
Sbjct 87925877 87925924

```

Sekuen *Reverse*

```

>ref|NT_005612.16| Homo sapiens chromosome 3 genomic contig, GRCh37.p2
reference primary assembly, Length=100537107
this part of subject sequence:transcription factor SOX-2
Score = 187 bits (101), Expect = 2e-45
Identities = 107/110 (97%), Gaps = 0/110 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2 61
CAGCGCATGGACAGTTACGCGCACATGAACGGCTGGAGCAATGGCAGCTACAGCATGATG
||||| |||||||
CAGCGCATGGACAGTTACGCGCACATGAACGGCTGGAGCAACGGCAGCTACAGCATGATG
Sbjct 87925757 87925816

Query 62 111
CAGGAGCAGCTGGGCTACCCGAGCACCCGGGCCTCAACGCGCACGGCGC
||||| |||||||
CAGGACCAGCTGGGCTACCCGAGCACCCGGGCCTCAATGCGCACGGCGC
Sbjct 87925817 87925866

```

Lampiran 10. 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 aluminium foil dengan suhu penyimpanan 2-4°C.
2.	Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 10 X	Sebanyak 60,55 g tris base, 3,77 g Na ₂ EDTA dan 30,92 g 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 TAE (Tris Asetat EDTA) 1 X	Sebanyak 10 mL dapar TAE 50 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
7.	Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 1 X	Sebanyak 50 mL dapar TBE 10 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Larutan APS (Ammonium Persulfate) 10%	Sebanyak 10 g ammonium per sulfate dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.
5.	Larutan stok Crystal Violet 1,6 µg/µl	Sebanyak 32 mg Crystal Violet dilarutkan dalam 20 mL aqua demineralisata 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 <i>loading buffer</i> 6X	Sebanyak 690 ul larutan gliserol 30%, 125 ul larutan stok Crystal Violet, 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.
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.

(lanjutan)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
10.	Larutan Trypan Blue 10 X	Sebanyak 200 mg Trypan Blue dilarutkan dalam PBS hingga tepat 50 mL.
11.	Larutan RNase Inhibitor	Sebanyak 5 µl larutan stok RNase Inhibitor ditambahkan 5 µl air bebas nuklease. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-4°C.
12.	Larutan dNTP <i>mix</i> 10 mM	Sebanyak 5 µl dATP 100mM, 5 µl dTTP 100mM, 5 µl dCTP 100mM, 5 µl dGTP 100mM, ditambahkan air bebas nuklease hingga volume akhirnya 50 µl. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-4°C
13.	Larutan Dapar TE (Tris EDTA) 1/3 X	Sebanyak 333 µl dapar TE 1x dilarutkan dengan air bebas nuklease hingga volume akhirnya tepat 1000 µl. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C.
14.	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 pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C.
15.	Larutan Stok Primer SOX2 R 500 uM	Sebanyak 93,8 µl dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C.
16.	Larutan Stok Primer PUM 1 F 500 uM	Sebanyak 77,6 µl dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C.
17.	Larutan Stok Primer PUM 1 R 500 µM	Sebanyak 54,6 µl dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-8°C.

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

Lampiran 11. 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 anorganik	
Kalisum klorida anhidrat	200
Feri nitrat	0,1
Magnesiun 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 12. Komposisi DMEM/F12

Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
Asam Amino	
Glisin	18,75
L-Alanin	4,45
L-Alanil-L-Glutamin	542
L-Arginin hidroklorida	147,5
L-Asparagin H ₂ O	7,5
L-Asam aspartat	6,65
L-Sistein hidroklorida H ₂ O	17,56
L-Sistin 2HCl	31,29
L-Asam glutamate	7,35
L-Histidin hidroklorida H ₂ O	31,48
L-Isoleusin	54,47
L-Leusin	59,05
L-Lisin hidroklorida	91,25
L-Metionin	17,24
L-Fenilalanin	35,48
L-Prolin	17,25
L-Serin	26,25
L-Treonin	53,45
L-Triptofan	9,02
L-Tirosin	55,79
L-Valin	52,85
Vitamin	
Biotin	0,0035
Kolin klorida	8,98
D-kalsium pantotenat	2,24
Asam folat	2,65
Niasinamid	2,02
Piridoksin hidroklorida	2,031
Riboflavin	0,219
Tiamin hidroklorida	2,17
Vitamin B12	0,68
i-Inositol	12,6
Garam anorganik	
Kalsium klorida (CaCl ₂) (anhidrat)	116,6
Cu sulfat (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0,0013
Ferri nitrat (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,05
Ferri sulfat (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,417
Magnesium klorida (anhidrat)	28,64
Magnesium sulfat (MgSO ₄) (anhidrat)	48,84
Kalium klorida (KCl)	311,8
Natrium bikarbonat (NaHCO ₃)	2438
Natrium klorida (NaCl)	6999,5

(lanjutan)

Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
Natrium fosfat dibasic (Na_2HPO_4) anhidrat	
Natrium fosfat monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	18,75
Zinc sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	4,45
Komponen lain	542
D-Glukosa	147,5
Hipoxantin Na	7,5
Asam linoleat	6,65
Asam lipoat	17,56
Fenol merah	31,29
Putrescine 2HCl	7,35
Natrium piruvat	31,48
Thymidine	54,47

Lampiran 13. 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 IPT02.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 14. Spesifikasi primer SOX2

EUROGENTEC AIT		Customer: Budiman	
EUROGENTEC AIT 25 Ayer Rajah Crescent #07-10 Singapore 139944 Tel: +65 6778 8822 Fax: +65 6778 2982 Email: oligos@aitbiotech.com		Address: Indonesia Order Number: AIT6929 Order Date: 07/08/2009 Remarks:	
Oligo Name: Sox2mid-463F		Oligo Number: 55004	
5'CAGGGCATGGACAGTTAC3'			
Delivered:	13 OD	No. Bases:	18
	431 ug	MW:	5609
	78.24 nmol	Tm:	45.2
Conc.:	782ul to 100 uM	Synthesis Scale:	50 nmole
		Purification:	Desalted
		Delivery Form:	Dry
		Quality Control:	Maldi-TOF
Oligo Name: Sox2mid-630R		Oligo Number: 55007	
5'CATGGAGTTGTACTGCAGG3'			
Delivered:	8 OD	No. Bases:	19
	278 ug	MW:	5884
	46.91 nmol	Tm:	45
Conc.:	469ul to 100 uM	Synthesis Scale:	50 nmole
		Purification:	Desalted
		Delivery Form:	Dry
		Quality Control:	Maldi-TOF
Printed on: 8/12/2009 2:45:54 PM		Page 2	

Lampiran 15. Spesifikasi primer PUM1



PT. Genetika Science Indonesia
 Jln. Duri Raya No 5D, Jakarta Barat 11510,
 Indonesia
 Attn : Dr Budiman Bela
 Tel: (62) 021-569821 37/38



Order ID : 112027
 PO Number : PTCEN-3046
 Report Date : 13-Apr-2011
 Total Oligos : 2

Oligonucleotide Datasheet for Dr Budiman Bela

SynthID	Oligo Name	Sequence	Med	Len	Scale	Purity	Tm(°C)	GC(%)	MW	OD	µg	pmol	To make 100 µM
942124	Pum1_forward	5'-TGA GGT GTG CAC CAT GAA C-3'		19	50 nmole	PCR Grade	60.2	52.6	5853	8.6	270.8	46261	add 463µl of dH2O
942125	Pum1_reverse	5'-CAG AAT GTG CTT GCC ATA GG-3'		20	50 nmole	PCR Grade	60.4	50.0	5157	6.6	209.3	33986	add 340µl of dH2O

Mixed Bases Nomenclature

W: all
 M: all
 C: C
 G: G
 T: T
 A: A
 N: any/all
 B: G/C
 D: G/C/T
 K: G/C/T/A
 S: G/C/T/A/C
 Y: G/C/T/A/G

Handling Procedures for Oligonucleotides


- It is recommended that oligos be suspended in a sterile buffered solution (e.g. TE or pH8) for longer shelf life.
- When re-suspending your oligos, vortex them sufficiently but we don't recommend spinning down after re-suspension.
- If your oligo is delivered in wet format, it will be at the concentration 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: oligobase-asia.com
 Technical Support: support@oligo-base.com
 Orders received after 5pm (GMT +8) will be processed the next working day.

Page 1 of 1

Lampiran 16. 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 5x10⁹ 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: *A. Dubois* Date: 05/12/10
0905/1 jmw/kl/pt

Lampiran 17. Sertifikat analisis *Qiagen OneStep* RT-PCR



QIAGEN® Certificate of Analysis

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

Quality Control **Passed**

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

- Exonucleases ✓
- Endonucleases ✓
- Ribonucleases ✓
- Proteases ✓

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

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

	Conductivity (mS/cm)	pH	
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x	—	8.60–8.80	✓
Performance: see application test			
Q-Solution, 5x	—	6.80–7.20	✓
RNase-free water	<0.005	—	✓

Quantitative determination of cationic components of the QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x. ✓

RNase-free water was certified to be free of RNase activity by comparing the degradation of rRNA with a positive control after 3 hours incubation at 37°C. The degradation of rRNA was less than in the positive control which contained 10 pg/ml RNase A. ✓

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

dNTP Mix, 10 mM each:
 Spectrophotometric analysis:

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

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

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

Certified by: *M. D. Jones* Date: 05/07/10
QIAGEN/1 (mm/dd/yy)