



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAMBAHAN MATRIGEL DALAM DMEM/F12, DMEM *HIGH GLUCOSE*, DAN *CONDITIONED MEDIUM* UNTUK
MEMPERTAHANKAN PLURIPOTENSI SEL PUNCA KANKER
PAYUDARA**

SKRIPSI

**ANNISA NOORYANI
0706264463**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENAMBAHAN MATRIGEL DALAM DMEM/F12, DMEM
HIGH GLUCOSE, DAN *CONDITIONED MEDIUM* UNTUK
MEMPERTAHANKAN PLURIPOTENSI SEL PUNCA
KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

**ANNISA NOORYANI
0706264463**

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

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Annisa Nooryani

NPM : 0706264463

Tanda tangan :

Tanggal : Juli 2011

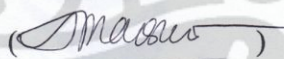
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Annisa Nooryani
NPM : 0706264463
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Penambahan Matrigel dalam DMEM/F12, DMEM
High Glucose, dan *Conditioned Medium* untuk
Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker
Payudara

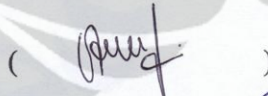
Telah berhasil dipertahankan dihadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si

()

Pembimbing II : Aroem Naroeni, DEA., PhD

()

Penguji I : Dr. Maksum Radji, M. Biomed

()

Penguji II : Dr. Arry Yanuar, M.S

()

Penguji III : Santi Purna Sari, M.Si

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2011

KATA PENGANTAR

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

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

1. Ibu Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing I, yang telah membimbing dan membantu penulis selama penelitian. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, kesabaran serta memberikan pengarahan selama penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Aroem Naroeni, DEA., PhD., selaku pembimbing II, yang telah membimbing dan membantu penulis selama penelitian. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, kesabaran serta memberikan pengarahan selama penelitian hingga menyelesaikan skripsi ini.
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 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. Joshita, selaku pembimbing akademis, atas doa, perhatian, semangat, saran, dan bantuan kepada penulis selama menjalani pendidikan 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 (Ayah Noor Tjahjono dan Ibu Riza Rosiana), adik (Siti Noor Azizah dan Rama Noor Hakim) yang telah memberikan dukungan, doa, semangat, nasihat, dan kasih sayang kepada saya selama ini.
8. Teman-teman seperjuangan selama di IHVCB yaitu, Liza, Kiki, Krisna, Fika dan para senior, Kak Aulia, Kak Nia, Kak Alid, Kak Atep, Kak Kober, yang selalu membantu selama pengerjaan skripsi ini.
9. Sahabat-sahabat saya di farmasi, Anis, Fifi, Maya, Kun, Wulan, Yoyo, dan semua teman yang telah berjuang bersama saya selama perkuliahan, Benny yang selalu mendukung dan menghibur, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga dapat terselesaikan skripsi ini.

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

Penulis

2011

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

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

Nama : Annisa Nooryani
NPM : 0706264463
Program Studi : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Penambahan Matrigel dalam DMEM/F12, DMEM *High Glucose*, dan *Conditioned Medium* untuk Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok
Pada tanggal: Juli 2011
Yang menyatakan

(Annisa Nooryani)

ABSTRAK

Nama : Annisa Nooryani
Program Studi : Farmasi
Judul : Penambahan Matrigel dalam DMEM/F12, DMEM *High Glucose*, dan *Conditioned Medium* untuk Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

Terapi kanker payudara dirasa belum efektif karena tidak mengeliminasi sel punca kanker. Maka sedang dikembangkan suatu terapi dengan sel punca kanker payudara sebagai target. Untuk mencapai hal tersebut, dipelajari sifat sel punca kanker payudara dengan metode *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi kultur yang baik untuk mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara. Sel dikultur dalam berbagai medium dengan penambahan matrigel, kemudian diukur sifat pluripotensinya. Sifat pluripotensi sel punca kanker payudara diukur dari jumlah penanda permukaan sel punca kanker payudara dengan metode spektrofotometri dan dari level ekspresi gen SOX2 sel punca kanker menggunakan metode *real-time* RT-PCR. Level ekspresi gen dinormalisasi menggunakan PUM1 sebagai kontrol dalam agar pengukuran lebih akurat. Hasilnya menunjukkan bahwa jumlah penanda permukaan tertinggi terdapat pada sel yang ditanam di DMEM/F12 dengan matrigel, kemudian DMEM *high glucose* dengan matrigel dan *conditioned medium* (CM) dengan matrigel. Pada pengukuran menggunakan *real-time* RT-PCR menunjukkan bahwa ekspresi SOX2 pada sel yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel dan DMEM *high glucose* dengan matrigel meningkat 19,97 kali dan 1,49 kali. Sedangkan pada CM dengan matrigel menurun 0,25 kali. Kami menyimpulkan bahwa kombinasi DMEM/F12 dengan matrigel merupakan kondisi yang paling optimum dalam mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara.

Kata kunci : kanker, sel punca, SOX2, PUM1, matrigel
xiv + 99 halaman : 16 gambar; 11 tabel; 12 lampiran
Daftar acuan : 91 (1959 – 2011)

ABSTRACT

Name : Annisa Nooryani
Program Study : Pharmacy
Title : Addition of Matrigel to DMEM/F12, DMEM High Glucose, and Conditioned Medium to Maintain Pluripotency of Breast Cancer Stem Cell

Current breast cancer therapies are considered inadequate in the effort to cure breast cancer patients because the breast cancer stem cells are not eliminated. Therefore, a new therapy with cancer stem cell as the target is currently being developed. In vitro methods were used to understand the breast cancer stem cell characteristics. This study aimed to find a good culture condition for breast cancer stem cells to be able to maintain the pluripotency. Cells were cultured in various media with the addition of matrigel and their pluripotency were measured. Pluripotency of breast cancer stem cells was measured by counting the amount of surface marker using spectrofluorometri and by measuring the expression level of SOX2 with real-time RT-PCR. The expression level was normalized using PUM1 as internal control, as the requirement of real-time RT-PCR technique. Results showed that cells in DMEM/F12 with matrigel have the highest amount of surface markers, followed by DMEM high glucose with matrigel and conditioned medium with matrigel. The measurement using real-time RT-PCR showed that the SOX2 expression in DMEM/F12 with matrigel as well as in DMEM high glucose with matrigel increased 19,97 and 1,49 times, respectively, whereas in conditioned medium with matrigel decreased 0,25 times. In conclusion, the combination of DMEM/F12 with matrigel is the best condition to maintain the pluripotency of breast cancer stem cells.

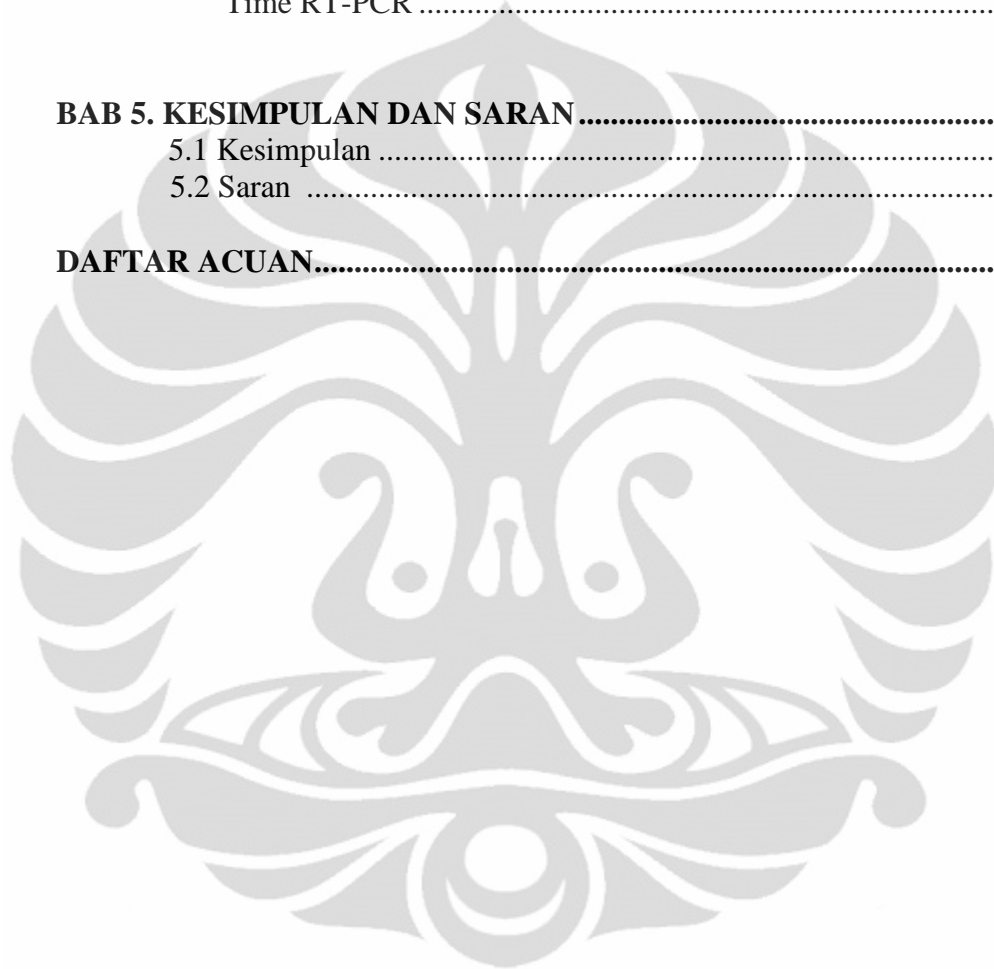
Keywords : cancer, stem cell, SOX2, PUM1, matrigel
xiv + 99 pages : 16 pictures; 11 tables; 12 appendices
Bibliography : 91 (1959 – 2011)

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1. Kanker Payudara	4
2.2. Sel Punca.....	5
2.3. Sel Punca Kanker Payudara.....	7
2.4. Identifikasi Sel Punca Kanker Payudara.....	8
2.5. Gen yang Menginduksi Pluripotensi Sel.....	10
2.6. Medium Kultur Sel Punca.....	12
2.7. Spektrofotometri Fluoresensi.....	14
2.8. Ekstraksi RNA	15
2.9. Normalisasi mRNA.....	16
2.10. <i>Complementary DNA</i> dan Enzim <i>Reverse Transcriptase</i>	18
2.11. <i>Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	19
2.12. Elektrophoresis Gel Akrilamid.....	23
2.13. <i>Real-Time</i> RT-PCR.....	24
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	28
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian	28
3.2. Perijinan dari Komisi Etik	28
3.3. Bahan	28
3.4. Alat	29
3.5. Cara Kerja	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	42
4.1. Pembuatan dan Penggantian Medium	42

4.2. Pelaksanaan Kultur Sel Punca Kanker Payudara.....	43
4.3. Pemanenan Sel.....	45
4.4. Analisis Pengukuran Penanda Permukaan Sel Punca Kanker Payudara dengan Spektrofotometer Fluoresens	45
4.5. Ekstraksi Total RNA.....	49
4.6. Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop	50
4.7. Optimasi Suhu dengan RT-PCR.....	51
4.8. Analisis Level Ekspresi Gen SOX2 dengan Menggunakan Real- Time RT-PCR	55
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	61
5.1 Kesimpulan	61
5.2 Saran	61
DAFTAR ACUAN.....	63



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Anatomi payudara normal manusia.....	4
Gambar 2.2. Karakteristik sel punca.....	6
Gambar 2.3. <i>Embryonic stem cell</i> dan <i>Adult stem cell</i>	7
Gambar 2.4. Letak gen SOX2 pada kromosom manusia.....	12
Gambar 2.5. Perubahan energi pada serapan radiasi UV/Vis yang menghasilkan fluoresensi.....	14
Gambar 2.6. Letak gen PUM1 pada kromosom manusia.....	18
Gambar 2.7. Proses RT-PCR	21
Gambar 2.8. Gambaran dari siklus RT-PCR.....	22
Gambar 2.9. Mekanisme fluoresensi dari SYBR <i>Green</i>	25
Gambar 2.10. Gambaran dari kurva <i>real-time</i> RT-PCR	26
Gambar 3.1. Skema kerja.....	30
Gambar 4.1. Kondisi kultur sel punca kanker payudara dari CS09 kanker pada berbagai medium.....	44
Gambar 4.2. Kurva hasil pengukuran spektrofotometri.....	47
Gambar 4.3. Kurva hasil pengukuran CD24/CD44 terhadap kontrol.....	48
Gambar 4.4. Hasil optimasi PCR untuk SOX2.....	54
Gambar 4.5. Hasil optimasi PCR untuk PUM1	54
Gambar 4.6. Kurva hasil normalisasi SOX2 dengan PUM1 pada pengukuran dengan <i>real-time</i> RT-PCR.....	59
Gambar 4.7. Hasil <i>real-time</i> RT-PCR gen SOX2 pada elektroforesis akrilamid 8%	59
Gambar 4.8. Hasil <i>real-time</i> RT-PCR gen PUM1 pada elektroforesis akrilamid 8%	60
Gambar 4.9. Mikroskop, sentrifus, spektrofotometri, mikrosentrifus, spektrofotometer nanodrop, alat RT-PCR	71
Gambar 4.10. Alat cetakan dan elektroforesis gel akrilamid, alat <i>real-time</i> RT-PCR, UV Transiluminator.....	72
Gambar 4.11. Penanda 100 bp	72
Gambar 4.12. Posisi desain primer SOX2	73
Gambar 4.13. Posisi desain primer PUM1.....	73
Gambar 4.14. Kurva SOX2 <i>real-time</i> RT-PCR	74
Gambar 4.15. Kurva PUM1 <i>real-time</i> RT-PCR	74

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 3.1. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan dalam RT-PCR ...	75
Tabel 3.2. Urutan basa primer untuk RT-PCR.....	76
Tabel 3.3. Isi dari komponen iScript™ One-Step RT-PCR Kit.....	77
Tabel 3.4. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses <i>real-time</i> RT-PCR.....	78
Tabel 4.1. Tabel pengukuran CD24 dan CD44 dengan spektrofotometri	48
Tabel 4.2. Hasil pengukuran RNA dari sampel CS09 kanker dengan spektrofotometri nanodrop	50
Tabel 4.3. Hasil optimasi SOX2 dan PUM1	53
Tabel 4.4. Hasil pengukuran ekspresi SOX2 dan PUM1 dengan <i>real-time</i> RT-PCR.....	58
Tabel 4.5. Hasil pengukuran CD24+ dengan spektrofotometri	79
Tabel 4.6. Hasil pengukuran CD44+ dengan spektrofotometri	80
Tabel 4.7. Perhitungan konsentrasi RNA untuk <i>real-time</i> RT-PCR.....	81

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Konposisi DMEM/F12	82
Lampiran 2. Komposisi DMEM <i>High Glucose</i>	85
Lampiran 3. Surat perijinan komisi etik	87
Lampiran 4. Skema proses sortir sel dengan MINIMACs <i>cells separator</i>	88
Lampiran 5. Spesifikasi primer SOX2	89
Lampiran 6. Spesifikasi primer PUM1	90
Lampiran 7. Pemeriksaan BLAST Nukleotida	91
Lampiran 8. Posisi Primer SOX2	92
Lampiran 9. Posisi Primer PUM1	93
Lampiran 10. Sertifikat analisis Qiagen RNeasy Mini Kit	95
Lampiran 11. Sertifikat analisis Qiagen OneStep RT-PCR	96
Lampiran 12. Cara pembuatan reagen	97

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sel punca (*stem cell*) telah menjadi fokus perhatian baik bagi kalangan peneliti maupun khalayak umum terutama dalam terapi berbasis sel. Sel punca adalah jenis sel khusus dengan kemampuan membentuk ulang dirinya dan dalam saat yang bersamaan membentuk sel yang terspesialisasi (Kirschstein, R. dan Skirboll, L.R., 2001). Kemampuannya untuk berproliferasi bersamaan dengan kemampuannya berdiferensiasi menjadi jenis sel tertentu inilah yang membuatnya unik (National Institute of Health, 2007).

Sel punca kanker atau *cancer stem cell* (CSC) adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor (Mei Zhang dan Rosen, 2006). Sifat *self renewal* pada sel punca kanker ini diduga memiliki peranan dalam sifat sel punca yang lain yaitu resistensinya terhadap obat. Peranan ini karena dalam salah satu mekanisme sifat *self renewal* adalah ketahanan sel dalam menghadapi xenobiotik. Salah satu agen yang terlibat dalam mekanisme menangkal xenobiotik ini adalah *ATP-binding cassette transporter* yang terekspresi dalam level tinggi dalam sel punca kanker pada kanker payudara (Zhou et al., 2001). Oleh karena itu, diduga sel punca kanker juga memiliki sifat resistensi terhadap kemoterapi.

Kanker payudara merupakan penyakit berbahaya yang banyak menyerang wanita di dunia. Insiden dari penyakit ini tinggi dan kematian yang disebabkan oleh kanker payudara menjadi masalah penting dalam dunia kesehatan (World Health Organization, 2006). Kanker payudara merupakan salah satu dari jenis kanker yang sering terjadi di seluruh dunia, dan juga sebagai kanker yang paling sering mempengaruhi kondisi psikologis wanita karena adanya kekhawatiran tentang keselamatan, bentuk tubuh akibat kehilangan payudara, yang mempunyai pengaruh negatif terhadap pasien. Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, kanker payudara di Indonesia menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh RS di Indonesia sebanyak 8.227 kasus

(16,85%), disusul kanker leher rahim sebanyak 5.7.86 kasus (11,78%). Hal ini sama dengan estimasi Globocan (IACR) tahun 2002 (Sekjen Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2010) dengan estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100 000 perempuan (Ferlay, 2002). Terapi kanker payudara yang dapat dilakukan berupa pembedahan, terapi radiasi, kemoterapi, terapi hormon.

Ekspresi gen SOX2, Oct3/4, Klf4 dan c-Myc diketahui dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel yang telah terdiferensiasi seperti fibroblast, yang disebut juga dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Ornella (2010), diketahui bahwa tingkat ekspresi dari gen SOX2 meningkat pada sel punca kanker payudara.

Pada kanker payudara manusia, sel punca kanker adalah sel yang memiliki atau ditandai dengan CD44+/CD24-/low/ESA+ *phenotype* (Al-Hajj, M., et al, 2003). Identifikasi sel punca kanker payudara merupakan langkah strategis dalam meningkatkan keberhasilan terapi kanker yang selama ini hanya dinilai dari pengecilan massa tumor tanpa usaha eliminasi sel punca kanker (Tang, Beng, dan Shazib, 2007; Song dan Miele, 2007). Oleh karena itu, sekarang ini sedang dikembangkan terapi dengan sel punca kanker sebagai target eliminasi. Untuk dapat mempelajari hal tersebut, pada umumnya digunakan metode *in vitro*. Maka dilakukan berbagai upaya dalam mempertahankan pluripotensi dalam membuat kultur sel punca kanker payudara guna mempelajari sel punca kanker payudara.

Umumnya kultur dilakukan dengan menggunakan media dengan kondisi kultur khusus agar sifat pluripotensi dari sel punca kanker tetap bertahan dan tidak terdiferensiasi. Yamamura, et al, (1993) pada penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan matrigel pada kultur sel dapat meningkatkan pertumbuhan kanker payudara dan mempertahankan sifat pluripotensinya. Matrigel berperan sebagai rekonstruksi dari *basement membrane*, yaitu tempat dimana sel punca hidup didalam tubuh sehingga diharapkan dengan penambahan matrigel pada medium dapat membantu mempertahankan sifat pluripotensi sel punca. Dari penelitian yang dilakukan oleh Chunhui Xu, et al (2001), pluripotensi sel punca dapat dipertahankan dengan menggunakan *feeder-free culture* yang mengandung matriks protein, seperti contohnya matrigel dan juga dengan faktor-faktor yang

Universtas Indonesia

terdapat pada *mouse embryonic feeder conditioned medium* (MEF-CM). Pada penelitian ini digunakan berbagai jenis medium yaitu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium*. Kemampuan medium yang dapat mempertahankan pluripotensi sel diteliti berdasarkan pengukuran ekspresi gen SOX2 karena peranan penting dari gen tersebut dalam menentukan pluripotensi dan pertumbuhan sel. Pengukuran level ekspresi gen SOX2 di dalam penelitian ini dilakukan dengan metode molekular kuantitatif menggunakan *Real Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (*Real Time RT-PCR*) menggunakan cetakan total RNA dan primer spesifik untuk gen target yaitu SOX2 dan *housekeeping genes* PUM1, dan juga menggunakan spektrofotometri untuk mengukur jumlah penanda permukaan sel punca kanker payudara.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penambahan matrigel ke dalam berbagai media (DMEM/F12, DMEM *high glucose*, dan *conditioned medium*) dan mengetahui kombinasi antara matrigel dengan medium yang tepat dalam mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara dengan parameter ekspresi penanda permukaan CD44+/CD24- dan ekspresi gen SOX2.

1.3 Manfaat Penelitian

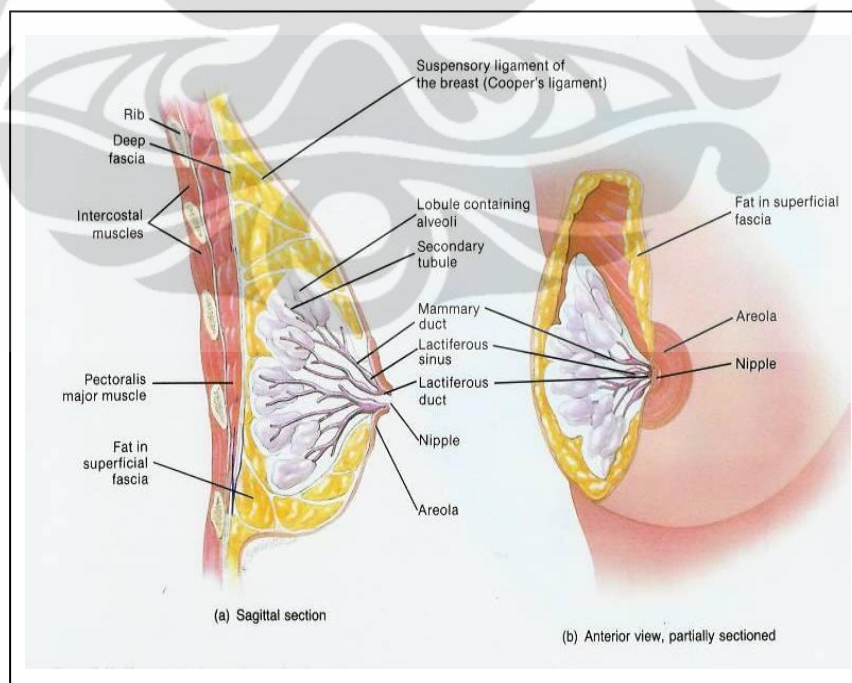
Manfaat dari penelitian ini adalah dengan memodifikasi medium kultur sel punca kanker payudara menggunakan matrigel dan mendapatkan kondisi optimum dari kombinasi medium dengan matrigel diharapkan mampu menghasilkan sel punca kanker payudara yang pluripotensinya tidak berubah. Dengan demikian sel hasil kultur dapat digunakan untuk mempelajari sel punca kanker dengan tujuan jangka panjang untuk mengembangkan terapi kanker payudara yang dapat memberikan hasil terapi yang lebih baik dibandingkan dengan terapi konvensional yaitu dengan target mengeliminasi sel punca kanker payudara.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Payudara adalah kelenjar yang terletak di bawah kulit yang berfungsi memproduksi ASI. Kelenjar payudara terdiri dari 15 sampai 20 lobus, yang dipisahkan oleh sejumlah jaringan adiposa. Pada setiap lobus terdapat beberapa kompartemen lebih kecil yang disebut lobulus, yang tersusun dari sekumpulan kelenjar pensекреksi susu yang mirip anggur, dikenal dengan istilah alveoli, dan melekat pada jaringan penghubung. Ketika susu diproduksi, susu keluar dari alveoli menuju *secondary tubules* kemudian menuju saluran payudara (*mammary ducts*). Di daerah dekat puting, saluran payudara berkembang membentuk lubang atau kantong yang disebut *lactiferous sinuses*, tempat dimana susu disimpan sebelum dikeluarkan melalui duktus laktiferus yang membawa susu dari salah satu lobus menuju ke eksterior (Tortora dan Derrickson, 2009).

Untuk gambar lebih jelas mengenai anatomi payudara normal manusia dapat dilihat pada gambar berikut ini :



[Sumber : Tortora dan Derrickson, 2009]
Gambar 2.1. Anatomi payudara normal

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang tidak terkontrol dan dapat menyebar ke bagian tubuh lainnya. Jika penyebarannya tidak terkontrol, maka dapat berujung pada kematian. Penyebab kanker dapat dikarenakan oleh 2 faktor yaitu faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal dapat berupa rokok, bahan kimia, radiasi dan organisme penginfeksi sedangkan faktor internal meliputi mutasi gen (misalnya gen BRCA1 dan BRCA2), hormon, kondisi imun, dan metabolisme (American Cancer Society, 2007).

Kanker payudara adalah pertumbuhan sel atau jaringan payudara yang tidak terkontrol dengan frekuensi kejadian yang tinggi. Kanker payudara sering ditemukan di seluruh dunia dengan insidens relatif tinggi, yaitu 31% dari seluruh kanker yang dialami oleh wanita (Pazdur et al., 2008). Insiden kanker payudara bervariasi antar populasi yang berbeda, angka insiden tertinggi terjadi di Amerika Utara dan Eropa bagian barat dan delapan kali lebih rendah pada wanita yang berasal dari Jepang dan China (Turnpenny dan Ellard, 2007). Di Indonesia sendiri penyakit ini sejak tahun 2005 hingga kini kanker payudara menempati posisi pertama pada kasus kanker di Indonesia (Depkes RI, 2007). Walaupun perbedaan angka insiden antar grup populasi ini dapat dikarenakan adanya perbedaan genetik, penelitian mengenai populasi imigran yang berpindah tempat dari suatu daerah yang rendah insiden kanker payudara ke tempat yang tinggi angka insidennya menunjukkan bahwa terjadi peningkatan risiko kanker payudara pada populasi asing tersebut. Hal ini membuktikan bahwa kanker payudara dapat terjadi karena adanya pengaruh lingkungan sekitar (Turnpenny dan Ellard, 2007).

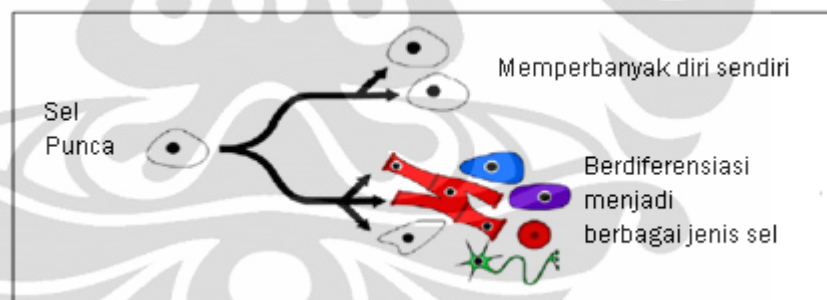
Terapi kanker payudara dilakukan berdasarkan keadaan pasien dan jenis kanker. Terapi dapat berupa pembedahan, kemoterapi, terapi hormon, dan terapi radiasi. Biasanya digunakan satu atau lebih macam terapi untuk mendapatkan hasil yang efektif (Nafrialdi dan Gan, 2007).

2.2 Sel Punca

Sel punca (*stem cell*) adalah sel yang belum berdiferensiasi yang kemudian dapat berdiferensiasi menjadi sel spesifik, masing-masing dengan fungsi sel yang khusus. Pada dasarnya, sel punca selalu berada dalam keadaan belum

berdiferensiasi sampai sel tersebut menerima sinyal untuk berdiferensiasi menjadi sel tertentu. Sel punca mempunyai sifat luar biasa untuk berkembang menjadi berbagai tipe sel dalam tubuh manusia. Sel punca menyediakan sistem perbaikan dengan membelah atau membagi diri tanpa batas untuk saling melengkapi dengan sel-sel lain. Ketika sel punca membelah, setiap sel baru memiliki potensial untuk tetap sebagai sel punca atau menjadi tipe sel lain dengan fungsi spesial, seperti sel darah, sel otak, dan lain-lain (Bongso dan Lee, 2005). Jadi, dapat dikatakan bahwa sel punca mempunyai karakteristik belum berdiferensiasi, mampu memperbanyak diri, dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel yang terdapat di dalam tubuh yang dikenal sebagai pluripotensi (Surya, 2010).

Ketika sel punca membelah, ada yang berubah menjadi sel yang spesifik (contoh : sel saraf, sel otot, atau sel otak), sementara yang lain tetap bersifat sebagai sel punca, yang siap untuk memperbaiki sel-sel yang rusak dalam tubuh. Sel-sel punca ini dapat secara berkesinambungan bereproduksi dan menjalankan tugasnya untuk memperbaharui jaringan yang rusak (Weiss et al., 1996).

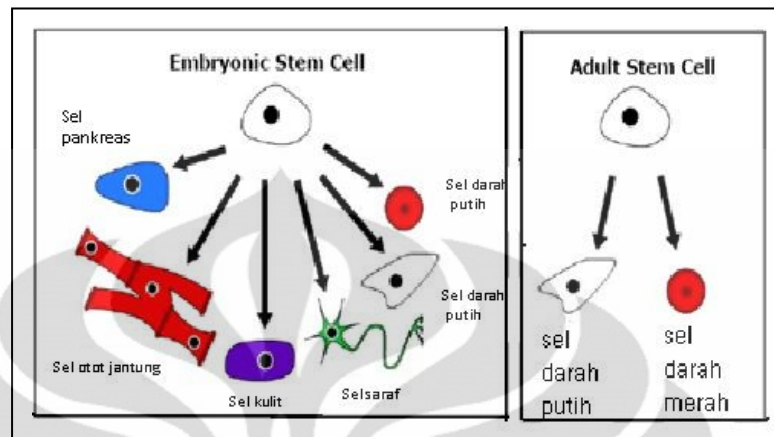


[Sumber : Life Sciences Learning Center, 2009]

Gambar 2.2. Karakteristik sel punca

Sel punca dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis menurut tingkat maturasi tubuh, yaitu *embryonic stem cell* dan *adult stem cell* (Surya, 2010). *Embryonic Stem Cell* diambil dari *inner cell mass* dari suatu *blastosit* (embrio yang terdiri dari 50 – 150 sel, kira-kira hari ke-5 pasca pembuahan), *embryonic stem cell* biasanya diperoleh dari sisa embrio yang tidak dipakai pada IVF (*in vitro fertilization*). *Adult Stem Cell* (ASC) diambil dari jaringan dewasa antara lain: sumsum tulang (*hematopoietic stem cell* dan *mesenchymal stem cell*) dan

jaringan lain seperti susunan saraf pusat, otot rangka, pankreas, payudara dan jaringan lainnya (Saputra, 2006).



[Sumber : Life Sciences Learning Center, 2009]

Gambar 2.3. *Embryonic stem cell* dan *Adult stem cell*

Pemanfaatan sel punca pada beberapa tahun terakhir pada terapi kanker adalah sebagai immuno-modulasi atau immuno-rekonstitusi pada pasien kanker yang sedang menjalani terapi kanker (Reya et al., 2001). Penggunaan dosis tinggi pada kemoterapi mempunyai efek samping terhadap sum-sum tulang belakang yang dapat menyebabkan myelosupresi. HSC (*Haematopoietic Stem Cell*) adalah jenis sel punca yang paling banyak digunakan sebagai transplantasi sel untuk menggantikan fungsi sum-sum tulang belakang dan untuk meningkatkan sistem imun tubuh sebelum menjalani proses kemoterapi selanjutnya (Sagar et al., 2007).

2.3 Sel Punca Kanker Payudara

Berawal dari penemuan leukemia *stem cells*, maka dimulai identifikasi dan isolasi subpopulasi sel dari kanker solid yang mempunyai kemampuan untuk menginisiasi dan mempertahankan kanker. Akhirnya, setelah menunggu lebih dari satu dekade lebih, pertanyaan tersebut bisa terjawab. Pada tahun 2003, para peneliti dari Michael Clarke berhasil menunjukkan keberadaan dari subpopulasi kecil sel pada kanker payudara yang berpotensi untuk menginisiasi sel kanker baru (Al-Hajj, M. et al, 2003). Para peneliti ini berhasil membuktikan bahwa terdapat suatu populasi kecil didalam tumor payudara yang berperan sebagai benih pembentukan sel-sel tumor baru. Jumlah sel punca kanker payudara ini tergolong

sedikit sekali dibanding sel kanker yang *mature*, akan tetapi jenis sel tadi memiliki kesamaan dengan sel punca pada umumnya. Sel inilah yang kemudian disebut sebagai sel punca kanker payudara (*breast cancer stem cell*).

Sel punca kanker payudara (*breast cancer stem cell/BCSC*) manusia dianggap diperoleh dari sel basal yang terletak pada membran basal dari unit alveolar pada kelenjar mammae dewasa manusia. Lebih jauh lagi, sel punca kanker menunjukkan ekspresi gen stres oksidatif-responsif yang tinggi, dimana keadaan ini memberi kemampuan pada mereka untuk resisten terhadap terapi antikanker, dibandingkan dengan sel bukan sel punca kanker. Berdasarkan hal itu, sel punca kanker merupakan konsep yang menarik, karena dapat menjelaskan mengapa kanker mengandung sel yang resisten terhadap radio dan kemoterapi (Kazuharu Kai et al., 2009).

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

2.4 Identifikasi Sel Punca Kanker Payudara

Sel punca kanker telah diketahui bersifat resisten terhadap kemoterapi. Oleh karena itu, penting untuk mengidentifikasi dan mengeliminasi sel-sel yang resisten terhadap obat-obat kemoterapi.

Melalui analisis dari penanda permukaan sel dan model xenotransplantasi, subpopulasi yang diduga sel punca kanker payudara yang ditandai dengan CD44

positif/CD24 negatif (CD44+/CD24-) dan mengandung aktivitas aldehid dehidrogenase 1 yang tinggi telah diisolasi sebagai jaringan kanker payudara. (Kazuharu Kai et al., 2009). Penanda permukaan sel dan aktivitas enzimatis dideteksi dengan menggunakan *fluorescence-activated cell sorter (FACS)* telah banyak digunakan untuk isolasi sel punca kanker. Sel punca kanker payudara, seperti yang telah disebutkan diatas, mengandung CD44+/CD24- (Al-Hajj, M. et al., 2003). Pada subpopulasi ini, aldehid dehidrogenase 1 dilihat sebagai substansi yang mempunyai aktivitas inisiasi tumor tertinggi. Lebih jauh lagi, analisis imunohistokimia dari ALDH1 pada sampel sel punca kanker payudara menunjukkan bahwa tingkat ekspresi yang tinggi dari ALDH1 berkorelasi dengan kecilnya kesempatan hidup (*survival*) dari pasien kanker payudara (Ginestier, C. et al., 2007).

CD 44 merupakan suatu molekul permukaan sel lekosit yang memainkan peranan penting dalam *cell mediated immunity*, resirkulasi limfosit, aktivasi sel T, adhesi ke sel lainnya dan matriks interseluler, metabolisme hyaluronida, transduksi sinyal melewati membran sel, dan sekresi faktor pertumbuhan. Ekspresi berlebihan gen ini terjadi pada keganasan dan kemampuan metastasis sel kanker (Azamris et al., 2003). CD44 telah diidentifikasi sebagai penanda (marker) pada sel punca kanker payudara dan kanker kepala dan leher.

Pada manusia, CD44 diekspresikan sangat kuat pada mesodermal sel, seperti hematopoetik, fibroblas, dan sel glial. Ekspresi CD44 ini telah ditemukan pada beberapa jenis kanker. Disini, ekspresi CD44 memainkan peran dalam migrasi sel kanker dan adhesi matriks dalam responnya terhadap lingkungan mikro selular (*cellular microenvironment*), sehingga meningkatkan agregasi selular dan pertumbuhan sel tumor. Lebih lanjut lagi, CD44 diidentifikasi sebagai penanda (*marker*) untuk sel punca kanker, termasuk sel punca kanker payudara dimana memiliki tumorigenitas dan potensi metastatik yang tinggi (Aruffo, A. et al., 1990; Al-Hajj, M. et al., 2003).

CD24, penanda (marker) permukaan sel, adalah suatu rantai tunggal sialoglikoprotein dengan berat molekul 42 kDa. Molekul CD24 adalah suatu glikoprotein, *glycocyl-phosphatidil-inositol (GPI)*. Molekul ini diekspresikan pada sel hematopoietik dan sel non-hematopoietik. Glikoprotein ini terdiri dari 27-35

asam amino dengan setengah dari asam aminonya adalah serin dan treonin. Serin dan treonin merupakan tempat yang potensial untuk ikatan O-glikosilasi dan asparaginasi memberikan potensi untuk berikatan N-glikosilasi. CD24 manusia memiliki struktur yang tidak biasa dengan inti hanya memiliki 31 asam amino. Molekul CD24 diekspresikan pada saat regenerasi jaringan. Molekul ini akan diekspresikan secara berlebihan pada keadaan *hematological malignancies* dan pada tumor padat seperti gastrik, renal, nasofaring, hepatoseluler, kolon dan kanker paru-paru (Motari et al., 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Al-Hajj dan rekan-rekannya menunjukkan bahwa CD24 tidak diekspresikan atau sedikit diekspresikan pada kanker payudara (Al-Hajj, M. et al., 2003).

2.5 Gen yang Menginduksi Pluripotensi Sel

Embryonic stem cells berasal dari *inner cell mass* pada tahap blastosis embrio yang dapat berdiferensiasi menjadi tipe sel apa saja, sel punca ini memungkinkan penggunaannya untuk terapi transplantasi sel. Bagaimanapun, risiko penolakan oleh sistem imun dan persoalan bioetika untuk penggunaan sel embrionik mendorong para peneliti untuk mempelajari mekanisme mempertahankan pluripotensi sel dan juga potensial jaringan. Pada tahun 2006, Takahashi dan Yamanaka sukses dalam menginduksi pembentukan sel punca fibroblast yang disebut juga dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPCS), dengan mengukur ekspresi dari empat faktor transkripsi yaitu SOX2, Klf4, Oct4 dan cMyc (Ocana dan Nieto, 2010). Informasi mengenai tingkat ekspresi dari keempat gen tersebut menarik untuk diketahui, terlebih lagi tingkat ekspresi dari keempat gen tersebut dapat menunjukkan sifat tumorigenik dari kanker payudara yang diderita oleh pasien. Oleh karena itu, penelitian tentang sel kanker punca payudara sangat diperlukan untuk dapat mengembangkan dan menerapkan teori tersebut.

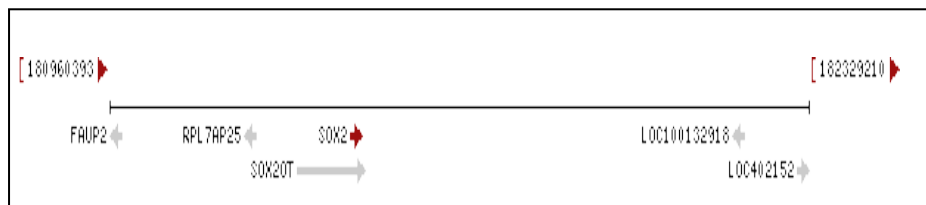
SOX protein adalah faktor transkripsi yang berhubungan dengan domain ikatan DNA 79-asam amino *high-mobility-group* (HMG) yang pertama kali diidentifikasi pada protein mamalia. SOX mempunyai peranan bervariasi pada perkembangan saraf, termasuk pemeliharaan sel punca saraf, spesifikasi sel glial, dan diferensiasi spesifik lineage. Lebih dari 20 anggota dari keluarga gen SOX telah diidentifikasi dalam mamalia. Diantara mereka, SOX2 yang pertama kali

ditemukan untuk mempertahankan pluripotensi dari sel punca saraf dan kemudian sel punca embrionik (Oscar Gee et al., 2010). Bersama OCT3/4 dan Nanog, SOX2 berperan sebagai regulator utama pada embryogenesis mamalia dan bagian dari jaringan kompleks faktor transkripsi yang mempengaruhi pluripotensi dan differensiasi sel punca embrionik (H. Fong dan Donovan, 2008).

Ekspresi SOX2 telah ditemukan pada 43% dari basal cell-like kanker payudara dan berhubungan kuat dengan CK5/6, EFGR, dan immunoreaktivitas vimentin, menandakan bahwa kemungkinan SOX2 memainkan peranan dalam diferensiasi fenotipe pada tumor (Rodriguez-Pinilla et al., 2007).

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

Pada studi yang dilakukan oleh Yupeng Chen et al (2008), dengan mempelajari 56 sampel sel kanker payudara dan 19 sampel sel payudara normal, dan mengacu pada sistem klasifikasi Bloom dan Richardson (1957) diketahui bahwa ekspresi berlebih SOX2 ditemukan pada 33,3% (3 dari 9) ductal carcinoma in situ (DCIS), 42,3% (11 dari 26) tumor stadium 2, dan 57,1% (12 dari 21) kanker stadium 3. Ini menunjukkan bahwa pada kanker payudara, level dari ekspresi SOX2 berhubungan kuat dengan stadium tumor dan dengan level dari ekspresi cyclin D1 pada sampel kanker payudara. Pada studi ini peneliti juga membuktikan bahwa SOX2 menyebabkan proliferasi dari sel kanker dengan memfasilitasi transisi G1/S dan meregulasi ekspresi gen cyclin D1 (CCND1). Studi ini juga menemukan bahwa protein SOX2 berpasangan dengan protein β -catenin dalam mengaktivasi gen CCND1.



[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657, 28 Desember 2010]

Gambar 2.4. Letak gen SOX2 pada kromosom manusia

2.6 Medium Kultur Sel Punca

Sebelum kultur sel dimulai, perlu diketahui informasi tentang sel dasar yang diberikan untuk mengetahui tipe media, bahan tambahan, dan rekomendasi lainnya yang sebaiknya digunakan.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) merupakan medium basal yang terdiri dari vitamin, asam amino, garam, glukosa, dan pH indikator. Namun, media ini tidak mengandung protein atau agen penumbuh. Media ini membutuhkan suplementasi untuk menjadi medium yang lengkap. Umumnya media ini disuplementasi dengan 5-10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma Aldrich, 2009). Selain itu, DMEM juga membentuk sistem buffer sodium bikarbonat (3.7 g/L) dan tentunya membutuhkan tingkat karbon dioksida buatan untuk membuat pH tetap pada kisaran yang diinginkan. Tingkat CO₂ yang optimal adalah 7-10% tapi banyak peneliti yang sukses menggunakan CO₂ sebesar 5%. Masalah potensial dari rendahnya tingkat CO₂ adalah pH dapat menjadi sangat tinggi. Saat terekspos pada tingkatan ambient dari CO₂, sodium bikarbonat akan membuat DMEM menjadi basa secara cepat. Inilah yang merupakan alasan kenapa kita umum mengamati media yang berwarna ungu yaitu mengindikasikan peningkatan dari pH (Invitrogen, 2009).

Sedangkan *conditioned medium* adalah medium yang mengandung berbagai komponen biologis aktif yang diperoleh dari kultur sel MEF sebelumnya, dilepaskan ke media dan dapat mempengaruhi fungsi sel tertentu seperti pertumbuhan sel dan lisis sel.

Matrigel atau matriks GeltrexTM adalah matriks terlarut dalam membran dasar, yang telah lama digunakan pada kultur sel. GeltrexTM berperan sebagai rekonstruksi dari *basement membrane* tempat dimana sel punca berada didalam tubuh. Matriks GeltreksTM mengandung laminin, kolagen IV, entaktin, dan

proteoglikan heparin sulfat (Invitrogen, 2009). Laminin adalah sebuah glikoprotein besar dengan berat molekul sekitar satu juta. Laminin merupakan unsur pembentuk utama dari lamina basal epitel. Bila diisolasi kemudian dilihat dengan mikroskop elektron, terlihat berupa molekul bergaris melintang dengan daerah globular dan mirip batang. Laminin terikat pada membran sel epitel dan sel otot, pada kolagen IV, dan pada proteoglikan heparan sulfat. Interaksi laminin ini memungkinkannya berperan penting pada perakitan lamina basal, bukan saja mengikat sel-sel epitel pada lamina basalnya namun juga mempengaruhi fenotipnya. Bila sel epitel tanpa lamina basal dikultur dalam kolagen tipe I, maka sifat filamen intermediatnya berubah, berhenti membuat produk normalnya, dan ditransformasi menjadi sel mirip fibroblas. Tetapi bila dikultur dalam gel dengan ekstrak lamina basal, dan karena mengandung laminin maka keadaan diferensiasi normalnya dapat dipertahankan. Jadi, laminin dan unsur pembentuk lamina basal lainnya mempengaruhi bentuk dan fungsi sel-sel epitel (Bloom dan Fawcett, 1994).

Untuk membuat medium kultur dengan tambahan matrigel, dapat dibuat dengan perbandingan 1 ml matrigel : 29 ml medium. Bersama pemakaian medium kultur sel normal (DMEM/F12), sel punca manusia dapat tumbuh dengan baik pada matriks Geltrex™ (Invitrogen, 2009).

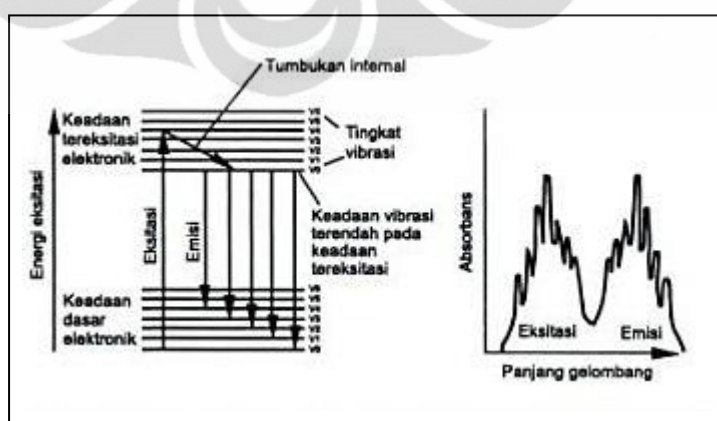
Berbagai penggunaan dari matrigel menggunakan ketebalan dan konsentrasi yang berbeda-beda. Konsentrasi protein ≥ 9 mg/ml digunakan untuk mempelajari diferensiasi dari sel punca manusia. Sedangkan konsentrasi dibawah 9 mg/ml tidak membentuk gel, dan hanya mendukung propagasi dan mempertahankan pluripotensi dari sel punca manusia (Invitrogen, 2009).

Berdasarkan penelitian ditunjukkan bahwa penggunaan matrigel bersamaan dengan *growth factor* yang terkandung pada *conditioned medium* dapat membantu mempertahankan pluripotensi sel punca dalam rentang waktu yang lebih lama (Chunhui Xu et al., 2001). Kemudian pada tahun 2005, dari penelitian yang dilakukan oleh Chunhui Xu dan 9 orang lainnya, diketahui bahwa *growth factor* yang berperan dalam mempertahankan pluripotensi sel punca adalah *basic fibroblast growth factor* (bFGF).

2.7 Spektrofluorometri

Fluoresensi molekular merupakan suatu proses emisi dimana absorpsi REM (Radiasi Elektromagnetik) menyebabkan molekul tereksitasi. Molekul tersebut akan kembali pada keadaan stabilnya (*ground state*) dan melepaskan energi sebagai foton. Relaksasi tersebut dapat berupa relaksasi fluoresensi atau berupa relaksasi nonradiatif. Panjang gelombang yang dapat digunakan agar terjadi fluoresensi adalah 200-800 nm. Metode fluoresensi lebih selektif daripada metode absorpsi karena hanya sedikit substansi yang berfluoresensi daripada yang mengabsorpsi sinar UV atau sinar tampak. Fluoresensi juga lebih sensitif daripada metode absorpsi karena dengan metode fluoresensi selalu akan lebih mudah untuk mengukur sinyal kecil terhadap blangko (Moffat et al., 2005).

Fluorofor adalah komponen yang menyebabkan molekul mengabsorpsi panjang gelombang spesifik kemudian memancarkan energi yang berbeda namun pada panjang gelombang spesifik yang sebanding. Jumlah dan panjang gelombang dari emisi bergantung pada fluorofor dan lingkungan kimia dari fluorofor tersebut (Sauer, 2011). Ada beberapa fluorofor yang dewasa ini sering dipakai sebagai label dalam uji imunofluoresens atau imunoasai fluoresens, yaitu *Fluorescein isothiocyanate*, *Rhodamine isothiocyanate*, *Umbelliferone*, *Lanthanide Chelates*. Diantara berbagai macam fluorofor tersebut, *Fluorescein* dan *Rhodamine* adalah yang paling sering dipakai (Handojo, 2003; Goldsby, 1992).



[Sumber: Watson, 2005]

Gambar 2.5. Perubahan energi pada serapan radiasi UV/Vis yang menghasilkan fluoresensi

2.8 Ekstraksi RNA

RNA atau asam ribonukleat merupakan makromolekul biologis yang berfungsi sebagai penyimpan dan penyalur informasi genetik. Masing-masing tipe RNA memiliki sejumlah fungsi yang berbeda. *Messenger RNA* (mRNA), ditranskripsi dari DNA, berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis protein. Sintesis protein dilakukan oleh ribosom, yang terdiri dari RNA ribosomal (rRNA) dan protein. Asam amino untuk sintesis protein dikirim ke ribosom oleh molekul RNA transfer (tRNA). Molekul RNA terdiri atas tRNA yaitu sebanyak 15 – 20% dan rRNA sebanyak 80 – 85% dari total RNA. Sedangkan mRNA hanya berjumlah 1 – 5% dari total RNA meskipun jumlah yang sebenarnya tergantung pada jenis dan kondisi fisiologis sel. Analisis pada mRNA dapat dijadikan gambaran ekspresi suatu gen karena jumlah mRNA berubah-ubah sesuai dengan kondisi lingkungan dibandingkan dengan jumlah DNA yang relatif stabil (Alberts et al., 1994).

Molekul RNA relatif tidak stabil dan mudah rusak terutama oleh RNAase yaitu suatu molekul yang sangat stabil, tidak membutuhkan kofaktor, sangat efektif pada konsentrasi rendah, dan banyak terdapat pada debu dan kulit manusia. Maka ketika ekstraksi RNA dilakukan, kontaminasi RNAse dapat dihindari dengan memakai sarung tangan. Pada ekstraksi RNA dilakukan deproteinisasi untuk memisahkan RNA dari protein dan penambahan DNase untuk merusak DNA sehingga selanjutnya RNA dapat diendapkan dengan etanol. Salah satu reagen khusus yang umumnya digunakan dalam ekstraksi RNA adalah guanidinium tiosianat yaitu suatu detergen yang dapat mendenaturasi protein dan inhibitor RNAse yang baik (Walker dan Rapley, 2000).

Penghitungan konsentrasi RNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm. Kemurnian RNA dapat dilihat dari nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm atau yang disebut dengan A260/A280. Nilai perbandingan harus ~ 2.1 yang menandakan bahwa RNA tersebut telah murni. Sebaiknya RNA diukur dalam larutan buffer untuk menjaga kondisi pH karena nilai perbandingan ini dapat dipengaruhi oleh pH. Nilai A260/A280 akan menjadi lebih rendah dan juga mengurangi sensitifitas dalam mengukur protein pada pH yang lebih rendah (Wilfinger et al., 2000).

2.9 Normalisasi mRNA

Analisis ekspresi gen dapat dilakukan dengan analisis RNA, dan contoh metode umum untuk analisis RNA adalah Northern blotting dan hibridisasi *in situ* (Parker & Barnes, 1999), *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Weis et al., 1992), *Rnase protection assay* (Hod, 1992), dan *quantitatif Real Time – Polymerase Chain Reaction* (qPCR) (Bustin, 2002).

Keuntungan dari *real-time* RT-PCR sebagai prosedur untuk pengukuran RNA dibandingkan metode konvensional adalah lebih sensitif, rentang dinamis lebih besar, dan mempunyai potensi tinggi sebagai analisis kuantitatif yang akurat. Untuk mencapai hasil yang diinginkan tersebut, dibutuhkan normalisasi yang sesuai sebagai kontrol untuk mengurangi kesalahan selama proses ekstraksi dan proses analisis RNA. Dalam analisis RNA juga terdapat banyak masalah, salah satunya adalah variasi yang terjadi dalam ekstraksi RNA yang akan mempengaruhi jumlah mRNA yang akan diamplifikasi. Perlu diterapkan beberapa strategi atau disebut normalisasi untuk meminimalisir variasi yang mungkin yang terjadi. Variasi pada jumlah mRNA ini akan mempengaruhi analisis level RNA, sehingga penentuan jumlah mRNA menjadi 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* (Huggett et al., 2005).

Terdapat banyak cara normalisasi yang dapat digunakan untuk normalisasi data *real-time* RT-PCR. Dari berbagai cara yang ada tersebut, disarankan untuk menggunakan penyeragaman jumlah RNA, kontrol terhadap kualitas RNA untuk menjamin kemurnian total RNA, dan normalisasi atau standarisasi mRNA dengan menggunakan *housekeeping genes* sebagai indikator. Ekspresi *housekeeping genes* ini telah dipelajari dalam sel normal maupun sel kanker yang penggunaannya terbukti efektif untuk mengontrol variasi yang terjadi pada analisis RNA (Huggett et al., 2005; Gale, 2005).

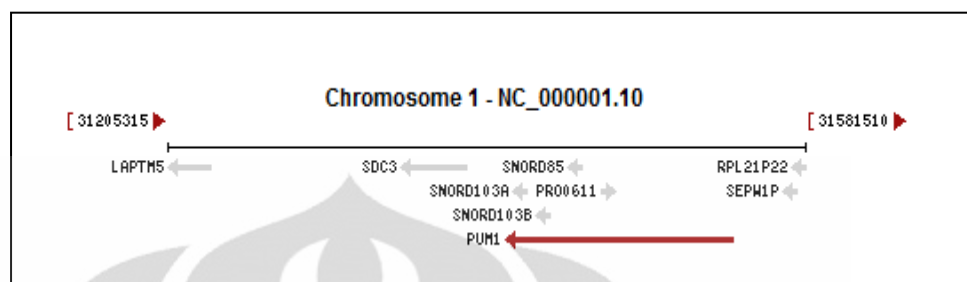
Housekeeping genes bertanggung jawab atas pemeliharaan dan aktivitas sel dan produknya penting bagi fisiologi sel. Gen ini disebut *housekeeping genes* karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan fungsional

umum dan penting di sebagian besar tipe sel dan tidak bergantung pada histologi sel (Vandesompele, 2002). *Housekeeping genes* yang ideal adalah gen yang ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada setiap kondisi percobaan yang berbeda. Oleh karena itu, tidak semua *housekeeping genes* dapat digunakan sebagai indikator tetap atau penanda ekspresi. Sebagai contoh, enzim ekspresi GAPDH telah banyak digunakan sebagai penanda kontrol ekspresi karena dianggap stabil ekspresinya. Namun demikian, Gale (2005), melaporkan bahwa dari analisis ekspresi GAPDH pada sekitar seratus sampel normal, displastik dan tumor jaringan melalui eksperimen hibridisasi *in situ* ditemukan bahwa ekspresi GAPDH semakin meningkat pada sampel normal, displastik dan tumor sehingga dapat disimpulkan secara khusus bahwa GAPDH tidak dapat digunakan sebagai kontrol yang tepat untuk studi ekspresi. Sedangkan pada suatu studi yang lain (Revilion et al., 2000) 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.

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

PUM1 merupakan gen yang mengkode keluarga protein PUF yang memiliki peran penting dalam proses pengikatan RNA. Protein ini memiliki hubungan dengan protein Pumilio pada *Drosophila*. Protein yang dikode oleh PUM1 ini memiliki bagian khusus untuk mengikat RNA dan menjadi regulator translasi dengan mengikat pada ujung 3' mRNA yang tidak diterjemahkan. Penemuan gen ini pada manusia diduga berperan penting dalam embriogenesis,

pertumbuhan dan diferensiasi sel (National Center of Biotechnology Information, 2010).



[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 28 Desember 2010]

Gambar 2.6. Letak Gen PUM 1 pada Kromosom Manusia.

2.10 Complementary DNA dan Enzim Reverse Transcriptase

Parameter yang sering digunakan dalam ekspresi gen adalah RNA. Contohnya dengan mengukur jumlah RNA pada metode *Northern analysis* dan *nuclease protection* yang menggunakan probe DNA atau RNA. Namun metode ini punya kelemahan yaitu RNA relatif tidak stabil dan RNA tidak dapat diamplifikasi secara langsung. Oleh karena itu, RNA dikonversi menjadi *complementary DNA* (cDNA) yang merupakan molekul yang lebih stabil dibandingkan RNA sehingga lebih aman dalam penyimpanan jangka panjang (Farrell, 2010).

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

Enzim *reverse transcriptase* yang digunakan untuk mensintesis cDNA dikenal dengan "*RNA-dependent DNA polymerase*". Ada beberapa jenis enzim *reverse transcriptase* yang dapat digunakan, yaitu (i) AMV yang didapat dari virus *Avian Myeloblastosis*; (ii) MMLV yang didapat dari virus *Moloney Murine Leukemia*; (iii) Modified RNase H- Enzyme; (iv) *rTh* yang diperoleh dari *Thermus thermophilus* (Mn²⁺ dependen). Penggunaan enzim tersebut mempunyai beberapa keuntungan dan

kerugian, misalnya AMV, enzim ini tahan pada temperatur 50°C atau lebih dan cocok untuk mentranskripsi cetakan yang lebih pendek namun mempunyai aktifitas RNase H yang tinggi yang dapat mendegradasi komponen RNA pada hybrid RNA:DNA sehingga dapat mengganggu proses sintesis cDNA, oleh karena itu aktifitas RNase H yang tinggi dianggap sebagai kontaminan. Sifat yang sebaliknya dimiliki MMLV, mempunyai aktifitas RNase H yang rendah dan hanya tahan pada suhu 37 – 40°C yang hanya bisa digunakan untuk cetakan yang lebih panjang (Farrell, 2010).

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

2.11 *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*

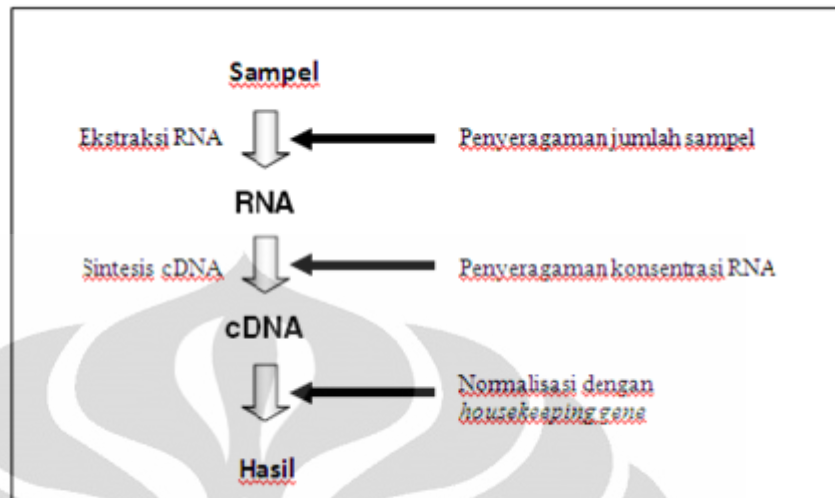
Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik yang dapat mengamplifikasi DNA cetakan menjadi jutaan kopi hanya dalam beberapa jam saja. Oleh karena itu PCR sangat sering digunakan pada studi tentang penyakit menular, mutasi gen, forensik, dan aktivitas transkripsi dalam sel dan jaringan dengan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

Prinsip dasar dari *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) adalah kemampuan enzim *reverse transcriptase* untuk membentuk sekuens *complementary DNA* (cDNA) dengan mRNA sebagai *template*. RT-PCR dapat menjadi metode yang cepat, serba guna, dan sensitif untuk menganalisa ekspresi dari suatu gen target dan memberikan informasi semi-kuantitatif tentang level ekspresi gen (McPherson dan Moller, 2006).

RT-PCR terdiri dari dua proses, yang pertama yaitu sintesis cDNA dari RNA dengan menggunakan *reverse transcriptase* (MMLV, AMV, *Modified RNase H- Enzyme* atau Mn^{2+} dependent). Pada proses ini RNA ditambahkan primer yang sesuai kemudian dilakukan pemanasan pada suhu $70^{\circ}C$ selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA, diinkubasi pada suhu $25^{\circ}C$ selama 5 menit untuk proses penempelan primer dan terakhir dipanaskan pada suhu $95^{\circ}C$ selama 5 menit untuk menginaktifkan *reverse transcriptase*. Primer yang digunakan berupa dua primer oligonukleotida, yaitu segmen DNA berutas tunggal (15-25 basa nukleotida) yang menentukan bagian awal dan akhir dari daerah yang akan diamplifikasi (Farrell, 2010; Erlich, 1989).

Proses kedua adalah proses amplifikasi cDNA. Pada proses ini terjadi proses denaturasi, *annealing* primer (penempelan primer) dan polimerasi oleh *Taq polymerase*. Denaturasi adalah tahap pemisahan materi genetik (DNA) dari bentuk *double stranded* DNA menjadi *single stranded* dan menghentikan semua reaksi enzimatik. Tahapan denaturasi umumnya dilakukan pada suhu $94^{\circ}C$ – $95^{\circ}C$. *Annealing* adalah tahap penempelan primer pada masing-masing cetakan *single stranded* DNA. Primer tersebut akan menggapit daerah DNA spesifik yang diperbanyak. Tahapan *annealing* umumnya dilakukan pada suhu $50^{\circ}C$ – $68^{\circ}C$. Polimerisasi adalah tahap pemanjangan primer sepanjang molekul DNA cetakan dengan bantuan polimerase termostabil seperti *Taq polymerase* yang berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. Enzim tersebut dapat membantu polimerisasi primer terhadap cetakan DNA dan dilakukan pada suhu cukup tinggi yaitu sekitar $72^{\circ}C$ – $78^{\circ}C$ dengan bantuan kation Mg^{2+} untuk penambahan nukleotida. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang digunakan DNA polimerase untuk membentuk DNA baru terdiri dari empat macam nukleotida, yaitu dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP (Sambrook Russel(b), 2001; Farrell, 2010; Erlich, 1989).

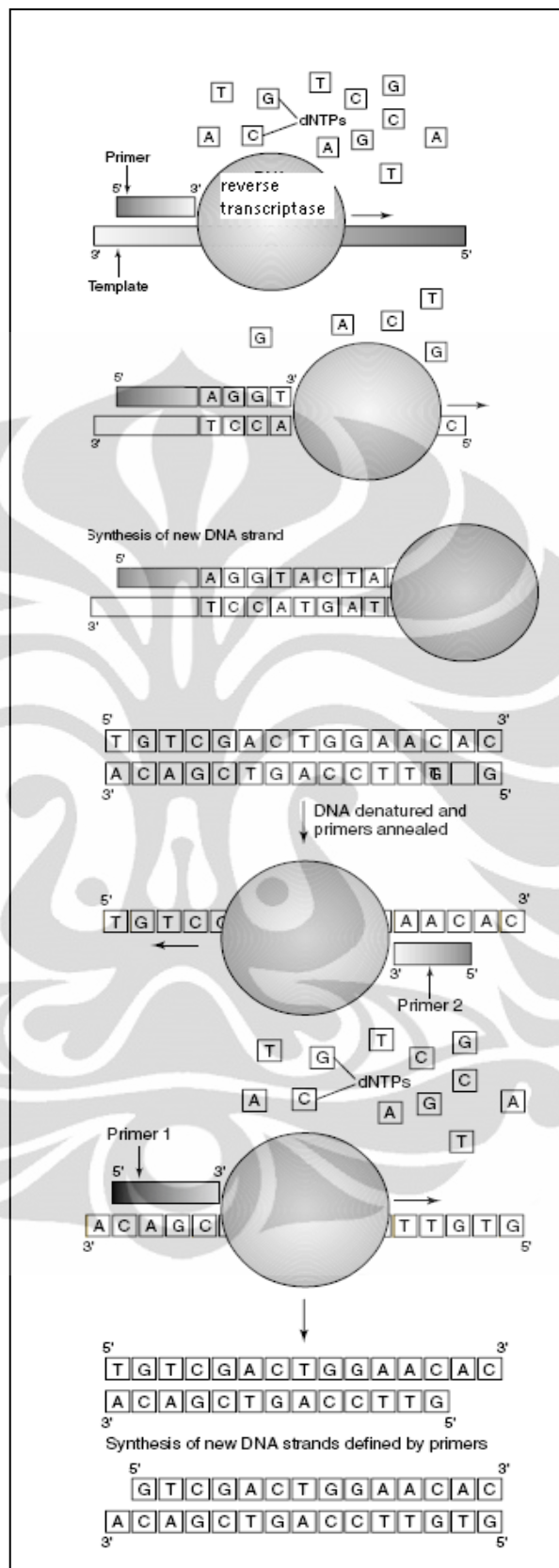
Tidak ada protokol pasti tentang proses RT-PCR, maka untuk mendapatkan hasil yang optimum membutuhkan optimasi kondisi PCR terlebih dahulu. Beberapa masalah yang sering terjadi dalam proses PCR adalah tidak munculnya amplikon yang diinginkan, pita amplikon tidak spesifik, pita amplikon yang dihasilkan berbentuk *smear* dan pita amplikon hanya kelihatan tipis sekali. Banyak faktor yang menyebabkan masalah tersebut.



[Sumber: Hugget et al., 2005]

Gambar 2.7. Proses RT-PCR. Panah hitam menandakan titik yang harus diperhatikan untuk strategi normalisasi yang baik

Optimasi PCR tidak dapat dilepaskan dari beberapa parameter diantaranya adalah konsentrasi ion magnesium, konsentrasi ion lain, konsentrasi dNTP, konsentrasi enzim, denaturasi, pelekatan primer, pemanjangan primer, jumlah siklus, primer, kualitas RNA cetakan, PCR *enhancers*, dan kontaminasi (McPherson dan Moller, 2006).



[Sumber: McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.8. Gambaran dari siklus RT-PCR

2.12 Elektroforesis Gel Akrilamid

Elektroforesis gel merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan memvisualisasi molekul DNA, RNA, dan protein (Sambrook et al, 1989). Prinsip dari elektroforesis gel adalah memisahkan molekul DNA, RNA, dan protein berdasarkan ukuran dan berat molekul yang bergerak melalui pori-pori gel dibawah pengaruh medan listrik dengan kekuatan tertentu (Sambrook dan Russel, 2001). Molekul DNA merupakan molekul yang bermuatan negative karena memiliki gugus fosfat. Molekul DNA tersebut selanjutnya akan bermigrasi menuju kutub positif. Kecepatan migrasi molekul DNA dipengaruhi oleh ukuran molekul, bentuk molekul, kekuatan arus listrik, jenis buffer, serta konsentrasi gel yang digunakan (Sambrook dan Russel, 2001; Dellis, 2009).

Gel yang umum digunakan dalam elektroforesis ada dua berdasarkan kemampuannya dalam memisahkan berbagai ukuran molekul yaitu gel agarosa (molekul DNA) dan gel poliakrilamid (molekul RNA dan protein). Agarosa merupakan polisakarida yang diekstrak dari rumput laut dan bersifat mudah hancur, serta mempunyai ukuran pori-pori gel cukup besar. Gel agarosa tersebut mampu memisahkan molekul DNA dengan ukuran sekitar 50 – 20000 pasang basa (Sambrook dan Russel, 2001). Penggunaan konsentrasi gel agarosa bervariasi bergantung dari besarnya molekul DNA yang ingin dianalisis. Persentase gel agarosa yang umum digunakan adalah 0,6%-1,5%. Semakin besar persentase konsentrasi agarosa maka semakin kecil molekul DNA yang akan dipisahkan (Sambrook et al., 1989).

Poliakrilamid merupakan polimer dari akrilamid, ukuran pori-porinya bervariasi tergantung dari konsentrasi akrilamid yang digunakan. Gel poliakrilamid umumnya mampu memisahkan molekul DNA dengan ukuran sekitar 50 – 500 pasang basa, tetapi juga dapat memisahkan molekul DNA sampai 1000 pasang basa tergantung dari persentase konsentrasi akrilamid yang digunakan. Persentase akrilamid yang umum digunakan sekitar 3,5%-20% (Sambrook dan Russel, 2001). Persiapan pembuatan gel agarosa lebih mudah dilakukan dibandingkan dengan gel poliakrilamid, tetapi hasil resolusi yang dihasilkan oleh gel poliakrilamid lebih baik dibandingkan dengan gel agarosa.

Elektroforesis gel akrilamid sering disebut juga *sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) (Fairbanks dan Andersen, 1999). Teknik SDS-PAGE merupakan metode elektroforesis untuk protein dalam kondisi terdenaturasi. Sodium dodesil sulfat (SDS) adalah senyawa deterjen bermuatan negative yang dapat melarutkan molekul hidrofobik dan memberikan muatan negative terhadap protein sehingga protein tersebut akan bermigrasi menuju kutub positif ketika dialiri arus listrik (Gallagher, 1995). Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh tegangan yang digunakan, konsentrasi akrilamid, dan ukuran DNA. Molekul yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang lebih besar. Untuk mengamati pemisahan yang terjadi digunakan pewarna, contohnya ethidium bromida, yang akan berinterkalasi dengan DNA dan akan muncul sebagai pita berwarna putih di bawah sinar UV (Franks, 1999).

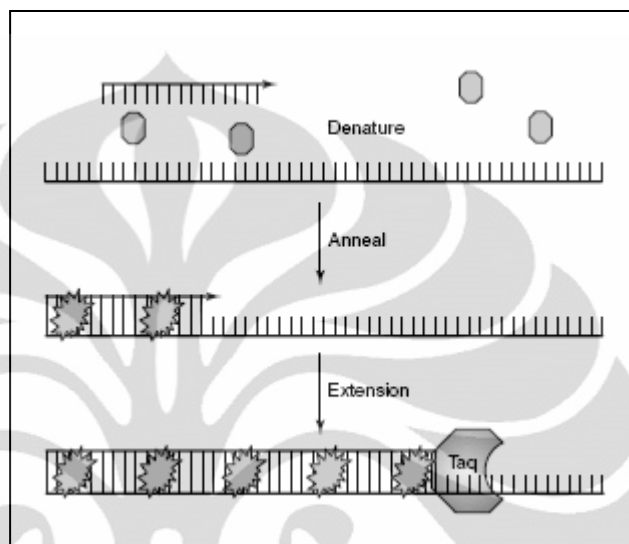
2.13 Real-time Reverse Transcription-PCR

Real-time reverse transcription PCR (*real-time* RT-PCR) adalah teknik untuk analisis kuantitatif mRNA dalam sampel biologis. Keuntungan dari prosedur ini dibandingkan dengan metode konvensional untuk menghitung RNA adalah pada metode ini lebih sensitif, rentang dinamis lebih besar, dan mempunyai potensi tinggi sebagai analisis kuantitatif yang akurat (Hugget et al, 2005).

Prinsip dasar dari *real-time* RT-PCR ini tidak jauh berbeda dengan RT-PCR biasa, yaitu cDNA disintesis dari mRNA menggunakan reverse transcriptase diikuti dengan amplifikasi cDNA dan perhitungan amplikon yang dihasilkan. Perbedaan mendasar antara *real-time* dengan RT-PCR biasa adalah (i) akumulasi amplikon dideteksi dan dihitung dengan fluoresensi, bukan dengan elektroforesis gel konvensional; (ii) akumulasi amplikon dihitung pada setiap siklus PCR, berbeda dengan RT-PCR konvensional yang hanya bisa dideteksi pada akhir reaksi (McPherson dan Moller, 2006)

Dua metode deteksi amplikon yang umum digunakan dalam *real-time* RT-PCR didasarkan pada *fluorescent DNA-binding dyes* atau *fluorescent probes*. SYBR Green I merupakan reporter fluoresens *non-specific sequence dye* sehingga dapat digunakan untuk amplifikasi dan pengukuran gen apa saja, lebih murah

dibandingkan dengan penggunaan *probe*, mudah digunakan, dan tidak mengganggu kerja DNA polimerase. Karena SYBR Green I berikatan dengan DNA utas ganda manapun, kerugiannya adalah dapat berikatan dengan primer-dimer dan juga dengan produk amplifikasi nonspesifik.



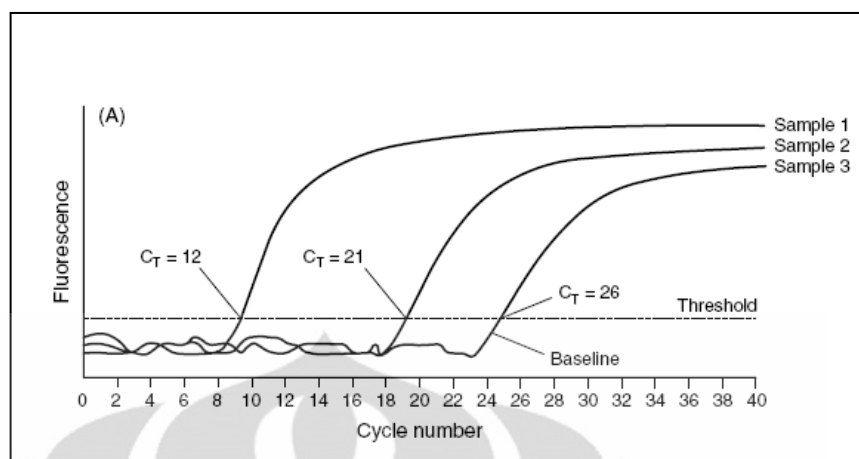
[Sumber: McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.9. Mekanisme fluoresensi dari SYBR Green

Fluoresens dapat berpendar ketika berikatan dengan produk amplikon, maka peningkatan sinyal fluoresensi saat proses amplifikasi berbanding lurus dengan jumlah dari produk amplifikasi. Identifikasi jumlah siklus dimana sinyal fluoresensi meningkat secara signifikan dapat dilakukan karena intensitas dari fluoresensi dimonitor dan dicatat pada setiap siklus PCR, dan ini berhubungan dengan jumlah awal *template*. Semakin tinggi konsentrasi *template* maka peningkatan sinyal fluoresensi secara signifikan akan terjadi lebih awal. Pada tahap awal reaksi amplifikasi, sinyal fluoresensi tidak terlihat atau hanya menunjukkan sedikit perubahan dan kondisi inilah yang dianggap sebagai *background fluorescence* atau *baseline* (McPherson dan Moller, 2006).

Threshold cycle (Ct) mengindikasikan jumlah siklus dimana fluoresensi melebihi nilai *threshold*, yaitu level dari fluoresensi yang menunjukkan bahwa reaksi amplifikasi berada pada fase eksponensial. *Threshold cycle* (Ct) menunjukkan reaksi ketika jumlah amplikon yang dihasilkan cukup untuk memberikan sinyal fluoresensi diatas *baseline* (McPherson dan Moller, 2006).

Universitas Indonesia



[Sumber: McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.10. Gambaran siklus dari *real-time* RT-PCR

Terdapat dua metode berbeda untuk analisis data *real-time* RT-PCR, yaitu perhitungan absolut (*absolute quantification*) dan perhitungan relatif (*relative quantification*) (Livak dan Schmittgen, 2001). Perhitungan absolut digunakan untuk menentukan dengan tepat jumlah kopi transkrip yang dibutuhkan, sedangkan perhitungan relatif berdasar pada perbandingan antara ekspresi gen target dengan gen referensi dan perbandingan ekspresi gen yang sama antara sampel perlakuan dan sampel kontrol (Yuan et al., 2006).

Perhitungan relatif perubahan ekspresi gen menggunakan *real-time* RT-PCR membutuhkan rumus tertentu, asumsi, dan berbagai uji terhadap asumsi tersebut untuk dapat menganalisis data secara tepat. Metode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ digunakan untuk menghitung perubahan relatif ekspresi gen dari percobaan *real-time* RT-PCR. Percobaan *real-time* RT-PCR melibatkan sampel kontrol dan sampel perlakuan. Pada masing-masing sampel, terdapat gen target dan gen referensi sebagai kontrol internal untuk amplifikasi PCR. Efisiensi dari amplifikasi PCR ditetapkan sebagai presentase (dari 0 sampai 1) atau sebagai waktu ketika produk PCR meningkat per siklus (dari 1 sampai 2). Jika tidak dicantumkan persentase efisiensi amplifikasi (PE) spesifik, maka digunakan efisiensi amplifikasi peningkatan produk PCR (E), yang bernilai 1 atau 2 (Yuan et al., 2006).

$$\text{Rasio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{\text{t target}}}}{(E_{\text{referensi}})^{\Delta C_{\text{t referensi}}}} \quad (4.1)$$

Dimana : $\Delta C_{\text{t target}} = C_{\text{t kontrol}} - C_{\text{t perlakuan}}$

$\Delta C_{\text{t referensi}} = C_{\text{t kontrol}} - C_{\text{t perlakuan}}$

ΔC_{t} untuk masing-masing gen (target dan referensi) kemudian dihitung dengan mengurangi nilai C_{t} dari sampel kontrol dengan nilai C_{t} dari sampel target. Seperti yang ditunjukkan pada rumus di bawah ini, perbandingan antara ekspresi gen target pada sampel target dengan sampel kontrol bisa didapatkan dari perbandingan antara efisiensi gen target (E_{target}) dengan $\Delta C_{\text{t target}}$ dan efisiensi gen referensi dengan $\Delta C_{\text{t referensi}}$. Metode $\Delta\Delta C_{\text{t}}$ dapat diambil dari model efisiensi-kalibrasi, jika kedua gen (target dan referensi) mencapai efisiensi amplifikasi PCR tertinggi. Pada keadaan ini, efisiensi target (E_{target}) dan efisiensi kontrol (E_{kontrol}) sama dengan 2, mengindikasikan bahwa amplicon terbentuk dua kali lipat pada tiap siklus (Livak dan Schmittgen, 2001).

$$\text{Rasio} = 2^{-\Delta\Delta C_{\text{t}}} \quad (4.2)$$

Dimana $\Delta\Delta C_{\text{t}} = \Delta C_{\text{t referensi}} - \Delta C_{\text{t target}}$

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 untuk payung penelitian yang berjudul ‘Analisis pluripotensi dan ekspresi *Manganese-Superoxide Dismutase* (MnSOD) pada sel punca kanker payudara’ sebagaimana terlampir pada Lampiran 3.

3.3 Bahan

Sampel yang digunakan berasal dari jaringan primer kanker payudara yang diperoleh dari pengangkatan tumor pasien penderita kanker payudara (CS09 kanker) dari Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM), Jakarta. Sampel sudah melalui serangkaian proses panjang yang dilakukan oleh tim IHVCB UI, mulai dari diambil dalam waktu kurang lebih satu jam setelah operasi pengangkatan tumor dan disimpan dalam keadaan dingin (2 – 5°C) untuk kemudian diproses di laboratorium hingga pengkulturan sel primer kanker payudara. Kultur sel primer CS09 kanker merupakan sampel yang dikoleksi oleh tim peneliti pada payung penelitian diatas. Bahan yang digunakan adalah DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) *High Glucose* [Gibco, USA], 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], Gentamicin 50 mg/ml [Sigma, USA], Natrium bikarbonat 7,5 % [Invitrogen, USA], BSA (Bovine Serum Albumine) [Promega, 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, MgCl [Qiagen, Jerman], RNase inhibitor [Invitrogen, USA], iScriptTM OneStep RT-PCR Kit with SYBR[®] Green [Biorad, Jerman], primer SOX2 [Eurogentec, Singapore], primer PUM1 [1st Base, Indonesia], Matrigel [Invitrogen, USA], Akrilamid [Promega, USA], Bisakrilamid [Promega, USA], Tris base [Promega, USA], asam borat [Promega, USA], EDTA [Promega, USA], ammonium persulfate [Promega, USA], TEMED (N,N,N',N' Tetrametyletilenediamin) [Biorad, USA], 6x *Loading Dye* [Vivantis, Malaysia], etidium bromida [Promega, USA], marker DNA 100 bp [New England Biolabs, UK].

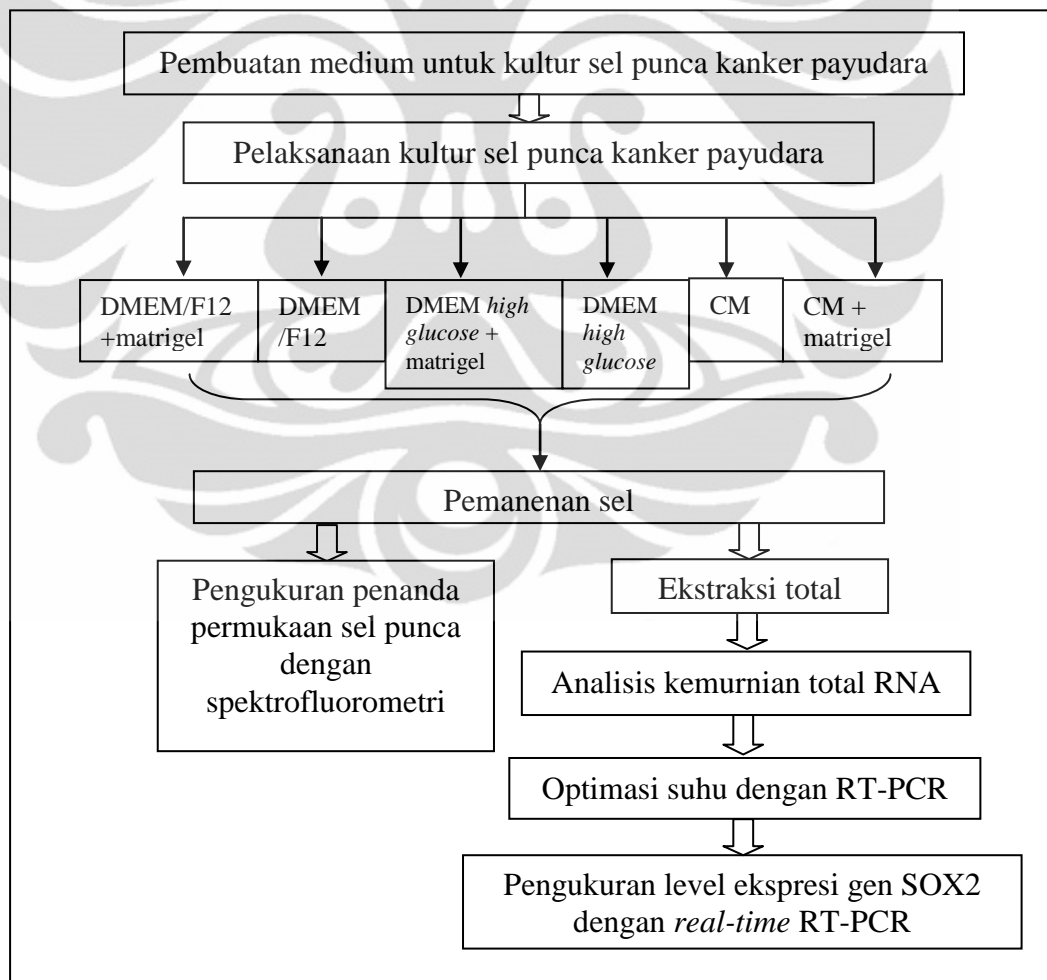
3.4 Alat

Peralatan yang digunakan selama penelitian antara lain vortex mixer, mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], *Biosafety Cabinet* (BSC) [Esco, China], spektrofotometer NanoDrop ND2000 [Thermo Scientific, USA], sentrifus [TOMY Digital Biology, Jepang], CO₂ Inkubator IL-60160-1491 [Barnstead, USA], *deep freezer* -80°C [New Brunswick Scientific, UK], timbangan analitik [Adventurer], mikropipet [Gilson, USA], lemari berpendingin [Sanyo, Jepang], *hemocytometer* [Assistent, Jerman], spektrofluorometri [Perkin-Elmer, USA], PCR Thermal Cycler PTC-200TM Programmable Thermal Controller [MJ Research, USA], alat elektroforesis [Biorad, USA], *Real-Time* RT-PCR CFX96 [Biorad, USA], wadah kultur [Biolab, Australia], tip pipet [Axygen, USA], *conical tube* 50 ml, 15 ml dan 10 ml [BD Biosciences, USA], pipet volume [Costar, USA], tube 2,0 ml, 1,5 ml, 0,5 ml [Axygen, USA], kamera digital [Sony, Jepang], mikroskop Olympus CKX-41 SF dengan lensa WHB-10X/20 [Olympus, Japan] [Olympus, USA], UV transilluminator [Biorad, USA], autoklaf [Hirayama, Jepang], *ice maker* [Hirayama, Jepang] dan alat-alat lain yang biasa digunakan dalam laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi.

3.5 Cara Kerja

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan berasal dari CS09 kanker. Selanjutnya dilakukan proses penyortiran yang dilakukan oleh tim IHVCB UI,

untuk memperoleh subpopulasi sel CD44+/CD24- menggunakan MINIMACs *cells separator* (Lampiran 4). Sel dikultur dengan 6 perlakuan berbeda, yaitu perlakuan (a) sel dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel, (b) sel dikultur dalam DMEM/F12, (c) sel dikultur dalam DMEM *high glucose* dengan matrigel, (d) sel dikultur dalam DMEM *high glucose*, (e) sel dikultur dalam *conditioned medium* dengan matrigel, dan (f) sel dikultur dalam *conditioned medium*. Setelah sel terlihat *confluent*, dilakukan pemanenan sel. Setelah itu sebagian sel diukur pluripotensinya berdasarkan penanda permukaan sel punca kanker payudara menggunakan spektrofotometri, dan sebagian sel diukur pluripotensinya berdasarkan level ekspresi gen SOX2 menggunakan *real-time reverse transcriptase-poly chain reaction (real-time RT-PCR)*. Skema kerja dan alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema kerja

3.5.1 Pembuatan Medium untuk Kultur Sel Kanker Payudara

Pada pembuatan DMEM/F12 (Lampiran 1) dimasukkan 500 μ l Penstrep dan 500 μ l Gentamicin ke dalam 50 ml larutan DMEM/F12. Campuran DMEM/F12 diambil ke dalam tabung baru dengan menggunakan syringe 10 ml dengan cara dilewatkan pada saringan filter 0,2 μ l. Tabung ditutup dan disegel dengan parafilm kemudian dimasukkan ke dalam kulkas. Sedangkan pada proses pembuatan DMEM *high glucose* (Lampiran 2) dimasukkan secara berurutan HEPES 500 μ l, natrium bikarbonat 1000 μ l, Penstrep 500 μ l, dan FBS 5 ml ke dalam 43 ml larutan DMEM *high glucose*. Setelah itu *conical tube* ditutup dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik *conical tube* secara seksama (jangan sampai berbusa). Kemudian *conical tube* 50 ml kosong disiapkan. Campuran DMEM *high glucose* tersebut diambil ke dalam tabung baru dengan menggunakan syringe 10 ml dengan cara dilewatkan pada *syringe* filter 0,2 μ l. Tabung ditutup dan disegel dengan parafilm. Kemudian disemprot dengan alkohol lalu dimasukkan ke dalam kulkas (Dulbecco & Freeman, 1959). *Conditioned medium* diambil dari kultur sel MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*) yang berusia sekitar 3 – 7 hari, dimasukkan ke dalam *conical tube*, kemudian dimasukkan ke dalam kulkas.

3.5.2 Pembuatan Medium dengan Matrigel untuk Kultur Sel Punca Kanker Payudara

Matrigel diambil sebanyak 1 ml dari *freezer* kemudian dicairkan dengan cara diletakkan di wadah berisi es dalam mesin pendingin dengan suhu 2 – 8°C selama semalam. Matrigel diaduk dengan cara dipipet ke atas dan ke bawah secara perlahan, jangan sampai menimbulkan busa. Matrigel sebanyak 1 ml diencerkan ke dalam 29 ml medium (DMEM/F12, DMEM *high glucose*, *conditioned medium*) yang telah didinginkan pada suhu 2 – 8°C. Larutan matrigel dituang dengan jumlah yang sesuai untuk melapisi seluruh area permukaan tumbuh (1,5 ml untuk plat 35 mm, 3 ml untuk plat 60 mm). Plat sumur yang telah dilapisi ini stabil selama 2 minggu selama disimpan pada suhu 2 – 8°C dan disegel dengan Parafilm® (jangan biarkan permukaan yang telah dilapisi mengering dan penting untuk selalu menjaga suhu penyimpanan pada 2 – 8°C

untuk menghindari terjadinya *premature gelling*). Inkubasi plat tersebut pada suhu 37°C selama minimum 60 menit. Pada saat akan digunakan, dianjurkan plat diletakkan pada suhu kamar satu jam sebelum pemakaian. Kemudian masukkan *stem cell* yang sudah disuspensikan dalam medium (Invitrogen, n.d.a).

3.5.3 Pelaksanaan Kultur Sel Punca Kanker Payudara

Jaringan kanker payudara pasien yang telah dijadikan suspensi sel (CS09 kanker) kemudian disortir oleh tim IHVCB sehingga didapatkan sel dengan penanda permukaan sel punca kanker payudara yaitu CD44⁺CD24⁻. Perlakuan kultur sel punca kanker payudara dilakukan dengan 6 perlakuan yang berbeda. Perlakuan (a) sel dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel, (b) sel dikultur dalam DMEM/F12, (c) sel dikultur dalam DMEM *high glucose* dengan matrigel, (d) sel dikultur dalam DMEM *high glucose*, (e) sel dikultur dalam *conditioned medium* dengan matrigel, dan (f) sel dikultur dalam *conditioned medium*.

Suspensi sel yang telah disortir dikumpulkan dalam *conical tube* tersebut disentrifus dengan sentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Setelah selesai disentrifus supernatan dibuang dan ditambahkan 1 ml medium pada pelet sel dan dihomogenkan dengan pemipetan. Setelah dihomogenkan, ambil 10 µl larutan medium yang mengandung sel dan dicampur dengan campuran 80 µl PBS dengan 10 µl *trypan blue*. Sebanyak 10 µl campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kamar hitung dan dihitung dengan bantuan mikroskop. Hasil perhitungan sel kemudian dimasukkan dalam rumus:

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

Setelah dihitung sel kemudian dibagi ke dalam 6 tabung mikrosentrifus dengan jumlah sel masing-masing tabung adalah 20.000 sel. Masing-masing tabung yang berisi suspensi sel kemudian ditambahkan dengan medium masing-masing perlakuan. Suspensi sel dipindahkan ke sumur (*well*) dan ditambahkan medium kultur masing-masing hingga volume 1 ml. Medium kultur sel diganti setiap 3 – 4 hari sekali atau sampai terlihat media menguning kecoklatan. Pada

saat penggantian medium, seluruh medium lama yang terdapat di dalam *well* dikeluarkan dengan menggunakan pipet. Kemudian dimasukkan 1 ml medium baru ke dalam *well*. Setelah itu diletakkan dalam inkubator pada suhu 37°C dengan kandungan CO₂ 5% (IHVCB, n.d. a).

3.5.4 Pemanenan Sel

Pemanenan kultur sel yang mengandung matrigel dapat dilakukan dengan medium di dalam *well* diambil dan dipindahkan ke dalam *conical tube*, kemudian kolagenase IV 10 mg/ml sebanyak 500 µl ditambahkan ke dalam *well*. Sel yang telah ditambahkan kolagenase IV diinkubasi selama 30 menit atau hingga sel lepas dari matrigel. Kemudian *well* dicuci dua kali masing-masing dengan 1 ml medium. Sedangkan untuk kultur tanpa matrigel pemanenan dapat dilakukan dengan memindahkan medium dari *well* ke dalam *conical tube* kemudian sel dicuci dengan PBS steril sebanyak 2 kali masing-masing 1 ml. Selanjutnya ditambahkan 500 µl larutan tripsin-EDTA ke dalam *well*. Sel yang telah ditambahkan tripsin diinkubasi selama 5 menit atau hingga sel lepas. Medium sebanyak 500 µl ditambahkan ke dalam *well* untuk menginaktivasi tripsin karena tripsin dapat bersifat toksik terhadap sel kemudian cuci kembali dengan 1 ml medium sebanyak dua kali dan dipindahkan ke tabung sentrifus untuk dianalisa dan sebagian lagi untuk disimpan (IHVCB, n.d. a).

3.5.5 Pengukuran dengan spektrofotometri

Sel diambil dari tiap *well* masing-masing 50.000 sel. Dari 50.000 sel tersebut dibagi ke dalam dua ependorf sehingga masing-masing ependorf berisi 25.000 sel. Suspensi sel dicuci dengan 1% BSA dalam PBS 500 µl sebanyak 2 kali kemudian diinkubasi dengan 1% BSA dalam PBS sebanyak 500 µl selama 20 menit. Kemudian ditambahkan antibodi anti CD24⁺ dan ke dalam ependorf yang lain ditambahkan antibodi anti CD44⁺ yang diikuti dengan inkubasi selama satu jam. Setelah itu sel dicuci dengan 1% BSA dalam PBS 500 µl sebanyak 2 kali. Selanjutnya sel diresuspend dengan PBS sebanyak 3 kali dan diukur dengan spektrofotometri. Untuk antibodi anti CD24⁺ diukur pada panjang gelombang

eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan untuk antibodi anti CD44⁺ diukur pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm (IHVCB, n.d. a).

3.5.6 Pengukuran dengan *Real-time* RT-PCR

3.5.6.1 Ekstraksi Total RNA (RNeasy Mini Handbook, 2010)

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan *RNeasy Mini Kit* (Lampiran 10). Prosedur yang digunakan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh produsen. Sebelum diekstraksi, sel terlebih dahulu difoto pertumbuhannya. Setelah itu, sel dipanen dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm. Pelet yang diperoleh diresuspensi dengan 1 ml medium kemudian sel yang terdapat di dalam suspensi tersebut dihitung jumlahnya dengan cara larutan medium dipipet sebanyak 10 µl kemudian dicampur dengan 90 µl campuran trypan blue dan PBS. Campuran tersebut dihomogenkan dengan pemipetan dan dimasukkan ke dalam *hemocytometer*. Sel kemudian dihitung dengan bantuan mikroskop. Larutan medium yang sudah dihitung jumlah selnya kemudian diseragamkan jumlahnya dengan jumlah sel dari *well* lain. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dibuang untuk mendapatkan pelet sel.

Langkah selanjutnya adalah melakukan ekstraksi total RNA. Sel yang dipanen ditambahkan dapar RLT sebanyak 350 µl dan dihomogenkan dengan pemipetan. Larutan tersebut dipindahkan ke *QIAshredder Spin Column* yang ditempatkan pada tube 1 ml dan disentrifugasi dengan mikrosentrifus berpendingin pada kecepatan 14000 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 disentrifugasi 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 µl, ditutup penutup dengan baik, disentrifugasi dengan mikrosentrifus berpendingin dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. *RNeasy Spin Column* dilepaskan dari tube 1 ml dan cairan dibuang dari tube

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

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

3.5.6.2 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop (Ausubel, 2001, NanoDrop 2000 *Spectrophotometer User's Manual*, 2009)

Untuk menganalisa kemurnian total RNA yang telah diekstraksi, digunakan spektrofotometri NanoDrop ND-2000. Sebelum digunakan sebaiknya permukaan optik bagian atas dan bawah dibersihkan dahulu dengan Kimwipes® yang telah dibasahi dengan aquabidest. *Software* NanoDrop dibuka dan dipilih module "Nucleic Acid" lalu dilakukan inisialisasi 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 1 µl sampel RNA pada permukaan optik bagian bawah, ditutup lengan dan diklik ‘Measure’. Setelah selesai, dibersihkan kedua permukaan optik dengan Kimwipes[®] dan *re-blank* dengan 1 µl air bebas nuklease. Pada pengukuran sampel RNA, perhatikan nilai 260/280. Nilai ini harus menunjukkan 1,8-2,1 untuk menentukan bahwa RNA telah murni.

3.5.6.3 Optimasi Suhu dengan RT-PCR

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

Penyiapan RT-PCR ini menggunakan *Qiagen OneStep RT-PCR* (Lampiran 11). Ke dalam mikro tube 0,5 ml ditambahkan masing masing 2 µl 5x *Qiagen OneStep RT-PCR buffer*, 2 µl *Q- solution*, 0,4 µl dNTP mix 10 mM, 0,6 µl primer *forward* 10 mM, 0,6 µl primer *reverse* 10 mM, 0,1 µl RNase inhibitor, 0,4 µl *Enzyme Mix*, 0,25 µl MgCl, 1,65 µl air bebas nuklease dan 2 µl RNA cetakan (RNA cetakan yang digunakan adalah RNA sampel dan RNA standar) yang sudah disamakan konsentrasinya. Volume akhir 10,0 µl (Tabel 3.1). Untuk kontrol negatif, tidak ditambahkan RNA cetakan dan air bebas nuklease yang ditambahkan 3,65 µl sehingga volume akhirnya 10,0 µl. Penyiapan RT-PCR ini harus dilakukan dalam es untuk menjaga agar enzim tidak bekerja sebelum dimasukkan ke dalam mesin PCR.

Sekuens primer untuk gen penyandi sel punca adalah sebagai berikut: SOX2 (FWD 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3'; REV 5'-CATGGA GTTGTACTGCAGG -3'), c-Myc (FWD 5'-TCTCAACGACAGCAGCTC-3'; REV 5'-AAGGTGATCCAGACTCTGAC-3') dan PUM1 (FWD 5'- TGAGGT GTGCACCATGAAC-3'; REV 5'- CAGAATGTGCTTGCCATAGG-3'). Keterangan lebih lanjut tentang primer tersebut dapat dilihat pada tabel 3.2, lampiran 8 dan lampiran 9.

Cetakan RNA yang akan digunakan untuk proses RT-PCR sebelumnya harus disamakan konsentrasinya. Setelah dilakukan penyeragaman ditambahkan 1 µl RNA inhibitor untuk 20 µl total RNA yang telah diencerkan.

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

b. Proses RT-PCR

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

Untuk gen SOX2:

Inisiasi	65°C	5 menit
	50°C	30 menit
	95°C	15 menit
	94°C	1 menit
Anealing	55,0-58,8°C	1 menit
	72°C	1 menit, 30 detik
	72°C	10 menit

Untuk gen PUM1 :

Inisiasi	65°C	5 menit
	50°C	30 menit
	95°C	15 menit
	94°C	1 menit
Anealing	55,0-58,8°C	1 menit
	72°C	1 menit, 30 detik
	72°C	10 menit

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

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

Sebanyak 4 µl larutan hasil RT-PCR ditambahkan dengan 2 µl *loading dye* diatas kertas parafilm. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel yang tersedia dengan hati-hati. Elektroforesis dinyalakan dan kondisi diatur dengan tegangan sebesar 110 volt dan arus listrik 400 A. Kemudian alat dijalankan selama 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 dengan pelindung (*hood*) dan hasilnya difoto. Foto gel dilakukan dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer sehingga dapat diedit dan dicetak.

- d. 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 diletakan pada lapisan kaca pada UV transiluminator dan difoto oleh kamera yang terhubung dengan UV transiluminator dan divisualisasikan oleh layar komputer.

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

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

3.5.6.4 Persiapan *Real-time* RT-PCR (Biorad *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR[®] Green Protocol*, 2000)

Persiapan RT-PCR ini menggunakan *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR[®] Green* [Biorad]. Ke dalam mikro tube 0,5 ml ditambahkan masing masing 12,5 µl 2x *SYBR[®] Green RT-PCR Reaction Mix*, 0,75 µl Primer *Forward* 10 µM, 0,75 µl Primer *Reverse* 10 µM, X µl air bebas nuklease, 2 µl cetakan RNA (RNA cetakan yang digunakan adalah RNA sampel dan RNA standar), 0,5 µl *iScript Reverse Transcriptase for One Step RT-PCR* (Tabel 3.3). Volume akhir 25,0 µl (Tabel 3.4). Untuk kontrol negatif, tidak ditambahkan RNA cetakan dan air bebas nuclelease ditambahkan hingga volume akhir mencapai 25 µl. Cetakan RNA yang akan digunakan untuk proses *real-time* RT-PCR sebelumnya harus disamakan

konsentrasinya. Penyeragaman ini dilakukan hingga konsentrasi cetakan RNA mencapai konsentrasi tertentu yang termasuk dalam rentang 1 pg – 100 ng/μl. Setelah dilakukan penyeragaman ditambahkan 1 μl RNA inhibitor untuk 20 μl total RNA yang telah diencerkan. Penyiapan *real-time* RT-PCR ini harus dilakukan dalam es untuk menjaga agar enzim tidak bekerja sebelum dimasukkan ke dalam mesin PCR.

Sekuens primer untuk gen penyandi sel punca adalah sebagai berikut:

SOX2 (FWD 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3'; REV 5'-CATGGAGTTGTACTGCAGG -3'), dan PUM1 (FWD 5'- TGAGGTGTGCACCATGAAC-3'; REV 5'- CAGAATGTGCTTGCCATAGG-3'). Keterangan lebih lanjut tentang primer tersebut dapat dilihat pada tabel 3.2.

3.5.6.5 Proses *Real-time* RT-PCR

Kondisi *real-time* RT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum. Pemilihan suhu didasarkan pada optimasi dengan RT-PCR pada uji pendahuluan.

Untuk gen SOX2:

Inisiasi	50°C		10 menit
	95°C		5 menit
	95°C		10 detik
Anealing	58,8°C		30 detik
	72°C		30 detik
	95°C		1 menit
	55°C		1 menit
	55-95°C	Increment 0,5	10 detik
	20°C		10 menit

Untuk gen PUM1 :

Inisiasi	50°C		10 menit
	95°C		5 menit
	95°C		10 detik

Anealing	55,0°C	30 detik
	72°C	30 detik
	95°C	1 menit
	55°C	1 menit
	55-95°C	Increment 0,5 10 detik
	20°C	10 menit

3.5.6.6 Pengukuran Level Ekspresi Gen SOX2 dan PUM1 dengan *Real-time* RT-PCR

Pengukuran RNA untuk level gen SOX2 dan PUM1 pada sampel CS09 kanker didalam berbagai medium dengan *real-time* RT-PCR dilakukan dengan RNA cetakan yang berasal dari hasil ekstraksi CS09 kanker yang sudah disamakan konsentrasinya. Hasil pengukuran Ct masing-masing gen dari sampel control (tanpa matrigel) dibandingkan dengan sampel target, kemudian dibandingkan lagi dengan nilai perbandingan Ct gen target dan gen referensi. Nilai ratio yang didapat menggambarkan peningkatan level ekspresi gen SOX2 pada medium yang berbeda.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan dan Penggantian Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini untuk kultur sel adalah DMEM/F12, DMEM *high glucose*, dan *conditioned medium* (CM). Penggantian medium dilakukan ketika sudah terjadi perubahan warna pada medium yang menunjukkan bahwa nutrisi dari medium telah habis untuk pertumbuhan sel. Pada proses penggantian medium DMEM/F12, setelah *conical tube* dikeluarkan dari *freezer* dan didiamkan hingga larutan medium mencair, kemudian ditambahkan Gentamycin dan Penstrep untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Pada proses penggantian medium DMEM *high glucose*, *conical tube* yang berisi larutan medium dikeluarkan dari *freezer* dan didiamkan hingga larutan medium mencair. Setelah mencair, ditambahkan dalam medium HEPES, FBS (*Fetal Bovine Serum*) sebagai *growth factor* untuk mendukung proliferasi sel dan untuk melekatkan sel ke dasar *well*, natrium bikarbonat untuk menjaga pH, dan Penstrep untuk mencegah kontaminasi bakteri dan jamur. Larutan medium yang sudah dicampur dengan bahan tersebut kemudian dihomogenkan dengan cara membolak-balikan *conical tube* dan disterilisasi dengan penyaringan sebelum digunakan. Sedangkan *conditioned medium* yang terdapat didalam *conical tube* dapat langsung digunakan.

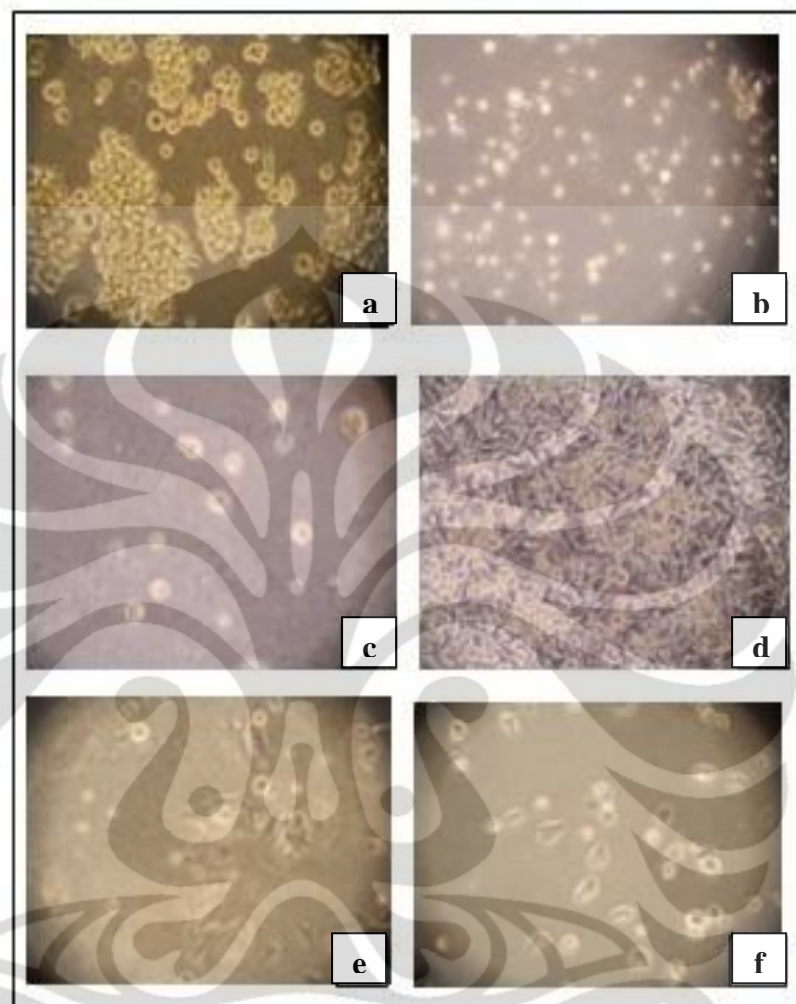
Penggantian medium dilakukan setiap 3 – 4 hari sekali atau sampai terlihat media menguning. Sebelum penggantian medium dilakukan, dilakukan pengamatan terlebih dahulu di mikroskop (Gambar 4.9) yaitu berupa sel yang melayang di medium atau melekat pada dasar *well*. Untuk sel yang melekat pada dasar *well*, penggantian medium dilakukan dengan membuang larutan medium yang berada dalam *well* dengan menggunakan pipet serologi. Kemudian larutan medium yang baru dipipet dan dimasukkan ke dalam *well* tersebut. Sedangkan untuk sel yang melayang, larutan medium yang berada dalam *well* diambil dengan menggunakan pipet kemudian dimasukkan ke dalam *conical tube* untuk disentrifugasi. Selama medium tersebut disentrifus, *well* yang telah diambil

larutan mediumnya diberikan larutan medium baru agar sel yang tertinggal didalamnya tetap hidup. Setelah disentrifus dan didapatkan pellet selnya, pelet diresuspensi dengan larutan medium kemudian dimasukkan kembali ke dalam *well* tersebut. Jika perlu tambahkan larutan medium sampai volume yang diinginkan pada *well* tersebut.

4.2 Pelaksanaan Kultur Sel Punca Kanker Payudara

Sampel yang berasal dari jaringan kanker payudara mengalami beberapa proses sebelum dapat digunakan untuk proses ekstraksi RNA. Sampel yang kemudian dilakukan isolasi jaringan dilakukan pada sampel yaitu dengan cara didisosiasi, dicuci dengan PBS dan medium DMEM, dipisahkan dari sel lemak, dipotong menjadi bagian yang lebih kecil kemudian dikultur pada *flask* yang berisi 5 ml medium DMEM. Kultur kemudian disimpan pada inkubator yang dialiri 5% gas CO₂. Pertumbuhan kultur tersebut dipantau setiap tiga kali seminggu untuk memastikan apakah sel tumbuh dengan baik. Jika sel tumbuh dengan baik, maka dilakukan proses selanjutnya yaitu penyortiran sel. Sel yang telah berhasil dikultur dengan baik, setelah dipanen kemudian disortir berdasarkan adanya marker sel punca kanker payudara yaitu CD44+ dan CD24-. Penyortiran sel ini dilakukan dengan MiniMacs *minibeads separator* yang menggunakan prinsip antigen-antibodi dalam proses penyortirannya. Isolasi jaringan payudara hingga dapat dikultur dan disortir dilakukan oleh tim IHVCB-UI.

Setelah melewati tahap penyortiran sel, maka akan didapatkan sel dengan marker CD44+/CD24- sesuai dengan yang diinginkan. Kemudian sel tersebut dikultur di dalam *well* yang berisi DMEM/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium* masing-masing sebanyak 20.000 sel.



Gambar 4.1. Kondisi kultur sel punca kanker payudara dari CS09 kanker pada berbagai medium a. DMEM/F12 + matrigel; b. DMEM/F12; c. DMEM *high glucose* + matrigel; d. DMEM *high glucose*; e. *conditioned medium* + matrigel; f. *conditioned medium*

Pertumbuhan sel yang ditanam pada berbagai media tersebut kemudian diamati pertumbuhannya. Sel yang ditanam pada media yang berbeda menghasilkan morfologi sel yang berbeda pula. Berdasarkan pengamatan, sel yang ditanam pada (a) DMEM/F12 dengan matrigel berbentuk bulat dan berkelompok dan banyak sel melekat pada matrigel, pada (b) DMEM/F12 terlihat sel berbentuk bulat, dan terapung di medium, pada (c) DMEM *high glucose* dengan matrigel terlihat sel melekat pada matrigel dan terlihat sel berbentuk bulat

dan ada pula yang menjalar (berdiferensiasi menjadi fibroblast), pada (d) DMEM *high glucose* pertumbuhan sel termasuk cepat dan banyak sel yang terdiferensiasi, pada (e) *conditioned medium* dengan matrigel pertumbuhan sel lambat dan terlihat sel berdiferensiasi, dan pada (f) *conditioned medium* pertumbuhan sel lebih lambat dibandingkan dengan sel yang ditanam pada *conditioned medium* dengan matrigel dan sel terlihat berdiferensiasi (Gambar 4.1).

4.3 Pemanenan Sel

Ketika pertumbuhan sel sudah *confluent* atau sudah muncul mammosphere maka sel tersebut dapat dipanen. Pemanenan kultur sel yang mengandung matrigel dapat dilakukan dengan penambahan kolagenase IV 10 mg/ml ke dalam *well*. Sel yang telah ditambahkan kolagenase IV diinkubasi selama 30 menit atau hingga sel lepas dari matrigel. Kemudian *well* dicuci dua kali masing-masing dengan 1 ml medium. Sedangkan untuk kultur tanpa matrigel pemanenan dapat dilakukan dengan penambahan larutan tripsin-EDTA ke dalam *well*. Sel yang telah ditambahkan trypsin diinkubasi selama 5 menit atau hingga sel lepas. Medium kemudian ditambahkan ke dalam *well* untuk menginaktivasi trypsin karena trypsin dapat bersifat toksik terhadap sel kemudian cuci kembali dengan 1 ml medium sebanyak dua kali dan dipindahkan ke tabung sentrifus untuk kemudian disentrifus dengan sentrifus (Gambar 4.9) dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit dan kemudian dihitung.

4.4 Analisis Pengukuran Penanda Permukaan Sel Punca Kanker Payudara dengan Spektrofluorometri

Setelah sel dari masing-masing *well* dihitung, dari tiap *well* diambil 50.000 sel. Dari 50.000 sel tersebut dibagi ke dalam dua ependorf sehingga masing-masing ependorf berisi 25.000 sel. Satu ependorf diberikan antibodi anti CD24+, sedangkan satu ependorf lain diberikan antibodi anti CD44+. Pengukuran CD24+ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan pengukuran CD44+ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm dengan spektrofluorometri (Gambar 4.9).

Universitas Indonesia

Hasil pengukuran FITC (*Fluorecein Isothiocyanate*) untuk antibodi anti CD24+ terhadap sel kanker yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel adalah 2,61, pada DMEM/F12 sebesar 5,10, pada DMEM *high glucose* dengan matrigel sebesar 2,87, pada DMEM *high glucose* sebesar 3,34, pada *conditioned medium* dengan matrigel sebesar 2,91, dan pada *conditioned medium* sebesar 4,48 (Tabel 4.1). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.5. Dari hasil pengukuran ini dapat dilihat bahwa jumlah sel yang tidak mengekspresikan CD24 tertinggi adalah sel yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel, kemudian diikuti oleh sel yang dikultur dalam *conditioned medium* dengan matrigel dan DMEM *high glucose* dengan matrigel (Gambar 4.2).

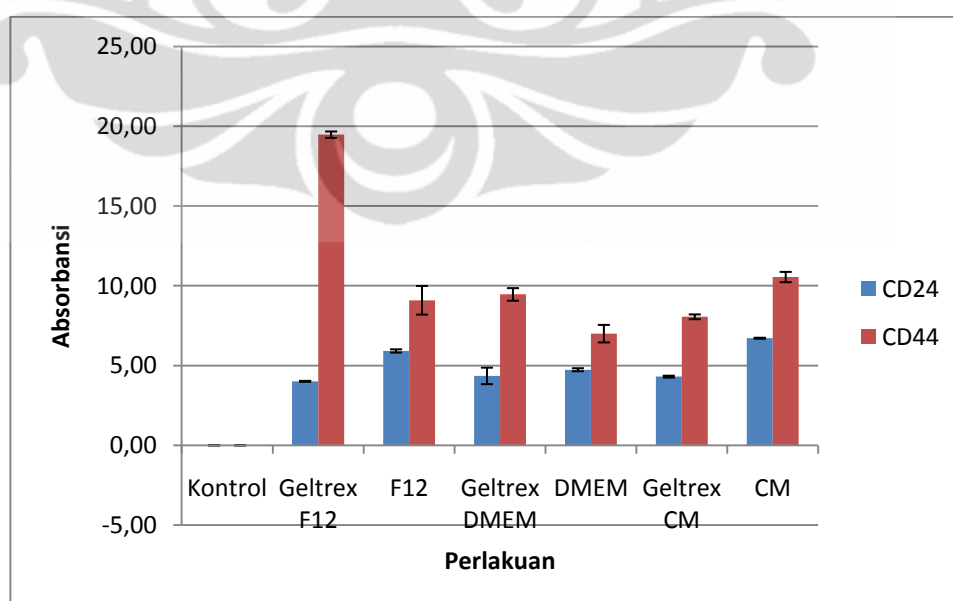
Sedangkan hasil pengukuran Rhodamine untuk antibodi anti CD44+ terhadap sel kanker yang ditanam di medium DMEM/F12 dengan matrigel adalah 19,10, pada DMEM/F12 sebesar 9,15, pada DMEM *high glucose* dengan matrigel adalah 9,40, pada DMEM *high glucose* adalah 6,62, pada *conditioned medium* dengan matrigel adalah 7,68, dan pada *conditioned medium* adalah 9,04 (Tabel 4.1). Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.6. Dari hasil pengukuran ini dapat dilihat bahwa jumlah sel yang mengekspresikan CD44 tertinggi adalah sel yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel, kemudian diikuti oleh sel yang dikultur dalam *conditioned medium* dan DMEM *high glucose* dengan matrigel (Gambar 4.2).

Hasil pengukuran tersebut tidak dapat langsung ditarik kesimpulan. Oleh karena itu, dilakukan perbandingan penanda permukaan CD44+/CD24- tiap sampel kemudian dibandingkan lagi dengan kontrol masing-masing. Hasil perbandingan antara penanda permukaan CD44+/CD24- tiap sampel menunjukkan bahwa sampel yang dikultur pada medium yang dikombinasikan dengan matrigel mempunyai nilai perbandingan penanda permukaan yang lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang dikultur tanpa matrigel. Dari hasil pengukuran dengan spektrofotometri menunjukkan bahwa matrigel dapat membantu mempertahankan sifat sel punca kanker payudara. Matrigel mempertahankan pluripotensi dengan berperan sebagai rekonstruksi lamina basalis, yaitu tempat melekatnya sel punca ketika berada di dalam tubuh.

Universitas Indonesia

Perbandingan penanda permukaan CD44+/CD24- tiap sampel kemudian dibandingkan lagi dengan kontrol masing-masing. Dapat dilihat bahwa sel yang ditanam didalam DMEM/F12 dengan matrigel menunjukkan nilai tertinggi yaitu sebesar 3,32, diikuti dengan sampel yang ditanam didalam DMEM *high glucose* dengan matrigel sebesar 0,69 dan *conditioned medium* dengan matrigel sebesar 0,30 (Gambar 4.3). Dari hasil ini diketahui bahwa kultur sel punca kanker payudara dalam DMEM/F12 dengan matrigel memberikan kondisi kultur yang paling baik dibandingkan dengan DMEM *high glucose* dengan matrigel dan *conditioned medium* dengan matrigel.

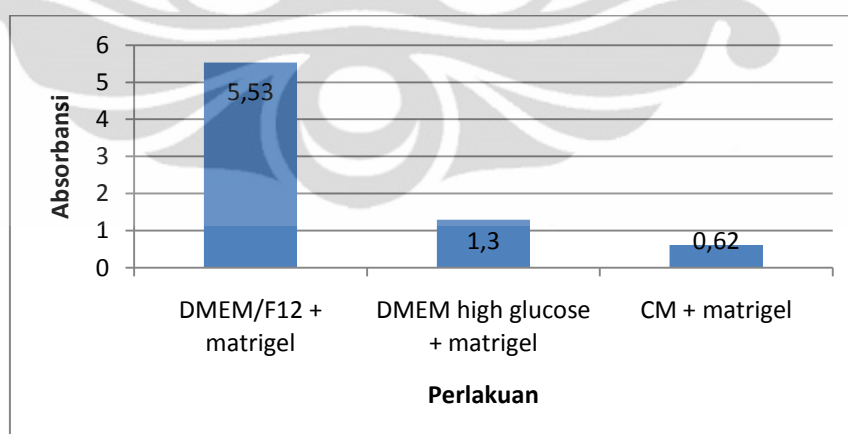
Kombinasi antara DMEM/F12 dengan matrigel dapat mempertahankan kepuncaan sel punca kanker payudara telah dibuktikan oleh Yanxia Liu, et al, (2006). Pada penelitian tersebut dilakukan kultur sel punca embrionik manusia menggunakan DMEM/F12 dan matrigel dengan penambahan *growth factor* lainnya seperti N2, N27, dan *basic Fibroblast Growth Factor*. Hasilnya, sel punca yang dikultur dalam medium tersebut memiliki kecepatan apoptosis yang rendah dan kecepatan proliferasi yang tinggi dibandingkan dengan sel punca yang dikultur dalam *conditioned medium*.



Gambar 4.2. Kurva hasil pengukuran spektrofotometri

Tabel 4.1. Tabel pengukuran CD24 dan CD44 dengan spektrofotometri

Perlakuan	CD24	CD44	Perbandingan CD44/CD24 tiap sampel	Selisih CD44/CD24 dengan kontrol
Kontrol	0,00	0,00		
Matrigel + DMEM/F12	2,61	19,10	7,32	5,53
DMEM/F12	5,10	9,15	1,79	
Matrigel + DMEM <i>High glucose</i>	2,87	9,40	3,28	1,30
DMEM <i>High glucose</i>	3,34	6,62	1,98	
Matrigel + <i>Conditioned medium</i>	2,91	7,68	2,64	0,62
<i>Conditioned medium</i>	4,48	9,04	2,02	



Gambar 4.3. Kurva hasil pengukuran CD44/CD24 terhadap kontrol

4.5 Ekstraksi Total RNA

Sel yang telah dipanen kemudian diukur ekspresi gen SOX2 untuk mengukur kepuncaan sel punca dari sel normal dan sel kanker payudara. Reagen untuk mengekstraksi RNA menggunakan RNeasy Mini Kit [Qiagen, Jerman] yang terdiri dari bahan – bahan sebagai berikut : dapar RLT yang mengandung *guanidine thiocyanate* 25-50% dan ditambahkan β -mercaptoetanol 10 μ l dalam 1 ml dapar RLT ; dapar RW1 yang mengandung *guanidine thiocyanate* 2,5 - 10% ; dapar RPE diencerkan dengan etanol 96- 100% ; air bebas RNase.

Setelah didapatkan jumlah sel pada tiap sampel dari cara perhitungan sel seperti yang telah dijelaskan diatas, lalu dilakukan penyeragaman jumlah sel pada tiap sampel menjadi $27,5 \times 10^4$ untuk kemudian dilakukan ekstraksi total RNA. Penyeragaman jumlah sel sebelum diekstraksi dilakukan sebagai langkah awal dalam menormalisasi RNA.

Sel yang sudah disamakan jumlahnya kemudian disentrifus dengan mikrosentrifus (Gambar 4.9) dan dibuang supernatannya untuk mendapatkan pelet sel. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan menggunakan kit dari Qiagen (RNeasy Mini Handbook, 2010). Pelet sel ditambahkan buffer RLT -yang sebelumnya telah ditambahkan β -mercaptoetanol. Buffer RLT mengandung garam guanidium tiosianat yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein yang merupakan komponen penyusun membran sel dengan merangsang transfer grup non polar ke dalam air sehingga akan meningkatkan sifat lipofilisitasnya. Sedangkan dengan adanya β -mercaptoetanol yang merupakan agen pereduksi yang efektif dalam menghambat kerja dari RNase, suatu enzim yang sangat stabil yang dapat mendegradasi RNA dan dapat bekerja dalam konsentrasi rendah, dengan cara mereduksi ikatan disulfide sehingga akan merusak konformasi enzim RNase dan menjaga keutuhan total RNA (RNeasy Mini Handbook, 2010).

Penambahan etanol pada tahapan ekstraksi total RNA bertujuan untuk mengendapkan materi asam nukleat dan menghilangkan kontaminasi protein. Buffer RW1 yang mengandung guanidine tiosianat dan etanol bertujuan agar pemecahan sel dan pengendapan materi asam nukleat berlangsung lebih efektif.

4.6 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

Uji selanjutnya adalah melakukan uji kemurnian terhadap total RNA yang sudah diekstraksi dengan menggunakan spektrofotometer Nanodrop (Gambar 4.9). Sampel yang diuji kemurniannya adalah sampel CS09 kanker yang akan dianalisis ekspresi SOX2. 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. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer Nanodrop, didapatkan konsentrasi total RNA untuk sel dalam medium DMEM/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium* berturut-turut adalah 44,93 ng/ μ l, 125,3 ng/ μ l, 20,3 ng/ μ l, 20,97 ng/ μ l, 8,93 ng/ μ l, 6,93 ng/ μ l dengan nilai A260/280 untuk sel dalam medium DMEM/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium* adalah 1,86; 2,05; 1,85; 1,85; 1,69; dan 1,46 (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Hasil pengukuran RNA dari sampel CS09 kanker dengan Spektrofotometri Nanodrop

No	Perlakuan	Konsentrasi (ng/ μ l)	A260/280
1.	DMEM/F12 dengan matrigel	44,93	1,86
2.	DMEM/F12	125,3	2,05
3.	DMEM <i>High glucose</i> dengan matrigel	20,3	1,85
4.	DMEM <i>High glucose</i>	20,97	1,85
5.	<i>Conditioned medium</i> dengan matrigel	8,93	1,69
6.	<i>Conditioned medium</i>	6,93	1,46

4.7 Optimasi Suhu dengan RT-PCR

Proses selanjutnya yaitu RT-PCR untuk mengamplifikasi gen target SOX2 dan *housekeeping genes* PUM1 dengan menggunakan primer spesifik untuk masing-masing gen. Sebelum mengukur ekspresi gen dengan menggunakan real-time RT-PCR dilakukan optimasi suhu pelekatan dengan menggunakan RT-PCR (Gambar 4.9). RT-PCR dilakukan dengan sistem satu langkah (*one step*) dimana proses *reverse transcription* dan proses PCR dilakukan dalam satu proses. Berbeda dengan RT-PCR dengan dua langkah (*two steps*) dimana sintesis cDNA dari total RNA dan amplifikasi cDNA dengan proses PCR terjadi dalam dua *tube* (*two tubes*), RT-PCR dengan satu langkah kedua proses tersebut dilakukan dalam satu *tube* (*one tube*). Penggunaan *one step* RT-PCR ini dipilih untuk mengurangi langkah kerja sehingga akan meningkatkan efisiensi dan efektifitas karena makin sedikit langkah kerja yang dilakukan akan semakin mengurangi kesalahan yang mungkin dilakukan (Bustin & Nolan, 2004).

Pada reaksi *reverse transcription* digunakan enzim *reverse transcriptase* yaitu suatu enzim yang dapat mensintesis cDNA dengan RNA cetakan (Farrell, 2010). Primer yang digunakan adalah primer *reverse* yang akan melekat pada ujung 3' rantai tunggal RNA. Lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit agar enzim *reverse transcriptase* dapat mensintesis cDNA. Kemudian masuk pada ke proses PCR dimana akan dilakukan proses prasiklus dengan suhu 95°C selama 15 menit, kemudian dilanjutkan dengan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik kemudian dilanjutkan dengan proses pelekatan yang berlangsung selama 1 menit dengan suhu berbeda-beda untuk tiap gen karena tiap primer berbeda suhu pelekatannya.

Hasil RT-PCR kemudian dianalisis menggunakan *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) dengan alat cetakan dan elektroforesis dari Biorad (Gambar 4.10) untuk mengetahui besar ampikon kemudian dilihat intensitasnya menggunakan alat uv transiluminator yang terhubung dengan kamera (Gambar 4.10). Pada penelitian kami ini, dipilih gel akrilamid dengan konsentrasi 8% karena hasil ampikon yang kami inginkan hanya sebesar 150-250 bp. Gel poliakrimid ini terbentuk dari polimerisasi akrilamid dan *cross-linkingnya* yaitu

Universitas Indonesia

bisakrilamid dengan ammonium persulfat sebagai inisiator dan TEMED sebagai katalis (Boyer, 2000).

Primer yang digunakan untuk *one step* RT-PCR adalah primer spesifik untuk gen SOX2 (Gambar 4.12 dan Lampiran 5) dan PUM1 (Gambar 4.13 dan Lampiran 6) sebagaimana yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Ornella, 2010). Primer SOX2 dirancang oleh tim IHVCB- UI dengan menggunakan software Bioedit[®] (Hall, 1999) dan Clustal X (Larkin, et al., 2007) sedangkan untuk sekuens primer PUM1 diperoleh dari jurnal bioteknologi (Szabo, A., et al, 2004). Kedua sekuens primer gen tersebut didesain berdasarkan *coding region* mRNA dari masing-masing gen tersebut. *Coding region* adalah area pada mRNA yang terdiri dari susunan nukleotida yang kemudian dapat ditranslasi menjadi polipeptida (Farrell, 2010). Penggunaan primer spesifik ini mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan penggunaan primer random hexamer atau oligo-dT karena primer spesifik dapat meningkatkan efektifitas karena sensitifitasnya yang hanya menempel pada sekuens spesifik dari gen yang ingin analisis (Bustin & Nolan, 2004).

Untuk proses pelekatan, harus dilakukan optimasi terlebih dahulu untuk mendapatkan suhu optimum masing-masing primer. Pada umumnya suhu perlekatan optimum lebih rendah 5°C dari T_m tiap primer. T_m adalah suhu dimana 50% proses pelekatan antara primer dan cetakan telah berlangsung. Oleh karena itu nilai T_m yang didapat ketika mendesain primer dapat dijadikan patokan dalam menyusun suhu optimum yang tepat untuk proses pelekatan. Untuk SOX2 dimana T_m primernya adalah 64°C, maka disusun suhu optimasinya adalah 55°C, 57,2°C, 58,8°C, dan 60°C. Sampel yang digunakan untuk optimasi kedua gen ini adalah sampel CS 14 kanker. Hasil pengamatan amplikon gen SOX2 dengan suhu perlekatan 55°C, 57,2°C, 58,8°C dan 60°C pada elektroforesis gel akrilamid 8 % menunjukkan terdapat satu pita spesifik yaitu sekitar 168 bp pada suhu 55°C, 57,2°C dan 58,8°C, sedangkan pada suhu 60°C tidak terdapat pita. Hasil pengukuran intensitas dari pita yang terdapat pada ketiga suhu tersebut berturut-turut adalah 1729,188 pixel, 1560,563 pixel dan 1816,063 pixel (Tabel 4.3). Hasil pengukuran intensitas menunjukkan bahwa suhu 58,8°C adalah suhu yang

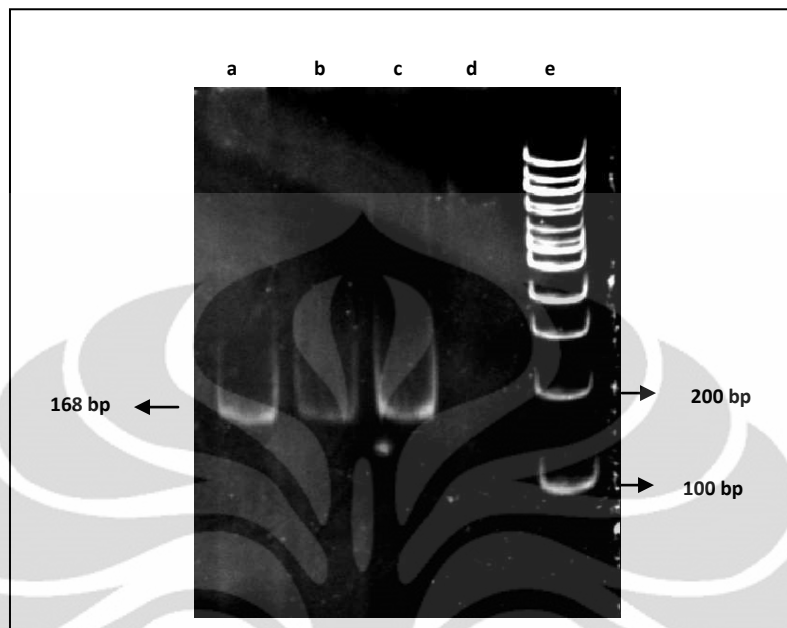
Universitas Indonesia

memberikan intensitas paling besar diantara ketiga suhu tersebut. Oleh karena itu suhu optimasi untuk gen SOX2 adalah 58,8°C dimana pada suhu ini memberikan intensitas pita yang paling kuat (Gambar 4.4).

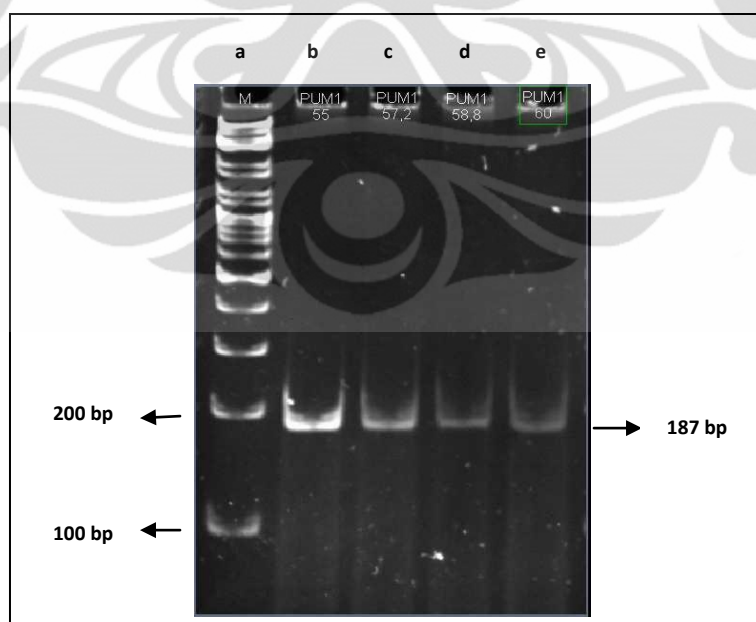
Sedangkan untuk PUM1, optimasi dilakukan dengan suhu 55°C, 57,2°C, 58,8°C, dan 60°C kemudian pita yang dihasilkan diukur. Pada keempat suhu tersebut menunjukkan satu pita spesifik yaitu pada ukuran sekitar 170 bp. Hasil pengukuran intensitas berturut-turut adalah 3835,438 pixel, 2977,000 pixel, 1970,438 pixel, dan 2708,000 pixel (Tabel 4.3). Dari hasil pengukuran intensitas didapatkan bahwa suhu 55°C adalah suhu optimum PUM1 karena memberikan intensitas paling kuat dibandingkan pita pada suhu yang lain (Gambar 4.5).

Tabel 4.3. Hasil Optimasi SOX2 dan PUM1

No	Gen	Suhu (°C)	Intensitas (pixel)
1	SOX2	55	1729,188
		57,2	1560,563
		58,8	1816,063
		60	-
2	PUM1	55	3835,438
		57,2	2977,000
		58,8	1970,438
		60	2708,000



Gambar 4.4. Hasil optimasi PCR untuk SOX2. a. 55°C; b. 57,2°C; c. 58,8°C ; d. 60°C; e. Marker.



Gambar 4.5. Hasil optimasi PCR untuk PUM1. a. Marker 2 Log ; b. 55°C; c. 57,2°C; d. 58,8°C ; e. 60°C .

4.8 Analisis Level Ekspresi Gen SOX2 dengan Menggunakan *Real Time RT-PCR*

Uji terakhir yang dilakukan adalah analisis kuantitatif level ekspresi gen SOX2 dengan *real-time RT-PCR* (Gambar 4.10). Pada uji ini digunakan suhu perlekatan (*annealing*) yang didapat dari hasil optimasi. Uji ini dilakukan dengan sampel sel punca kanker payudara dari CS09 kanker yang telah ditanam di berbagai medium dan RNA cetakan yang digunakan adalah RNA cetakan dengan konsentrasi 1,17 ng/ μ l (Tabel 4.7). Data C_T yang didapatkan dari hasil pengukuran dengan *real-time RT-PCR* kemudian dianalisis dengan metode $\Delta\Delta C_T$ untuk mendapatkan angka perbandingan level ekspresi gen antara sampel perlakuan dengan sampel kontrol.

Nilai C_T pada amplifikasi gen SOX2 dari sel yang ditanam pada medium DMEM/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium* berturut-turut adalah 28,45; 29,20; 29,47; 30,10; 28,35; 30,97 (Gambar 4.14).

Sedangkan nilai C_T pada amplifikasi gen PUM1 dari sel yang ditanam pada DMEM/F12 dengan matrigel, DMEM/F12, DMEM *high glucose* dengan matrigel, DMEM *high glucose, conditioned medium* dengan matrigel, dan *conditioned medium* berturut-turut adalah 29,81; 27,26; 29,92; 30,97; 33,48, 32,27 (Gambar 4.15).

Nilai C_T tersebut dianalisis dengan metode $\Delta\Delta C_T$. langkah pertama yaitu mencari ΔC_T setiap gen dari masing-masing sampel perlakuan dengan mengurangi nilai C_T kontrol dengan nilai C_T perlakuan. Nilai ΔC_T yang didapat untuk gen SOX2 adalah 0,75 untuk sel pada DMEM/F12 dengan matrigel, 0,63 untuk sel pada DMEM *high glucose* dengan matrigel, dan 2,62 untuk sel pada *conditioned medium* dengan matrigel. Sedangkan nilai ΔC_T yang didapat untuk gen PUM1 adalah -2,55 untuk sel pada DMEM/F12 dengan matrigel, 1,05 untuk sel pada DMEM *high glucose* dengan matrigel, dan -1,21 untuk sel pada *conditioned medium* dengan matrigel (Tabel 4.4).

Dari nilai ΔC_T tersebut dapat diperoleh perbandingan tingkat ekspresi gen *sox2* ($2^{\Delta\Delta C_T}$) yang dibandingkan dengan kontrol. Ekspresi gen SOX2 pada sel yang ditanam dalam DMEM/F12 dengan matrigel meningkat 19,97 kali dibandingkan kontrol yaitu sel yang ditanam pada DMEM/F12, ekspresi gen ekspresi gen SOX2 pada sel yang ditanam dalam DMEM *high glucose* dengan matrigel meningkat 1,49 kali dibandingkan kontrol yaitu sel yang ditanam pada DMEM *high glucose*. Sedangkan ekspresi gen SOX2 pada sel yang ditanam pada *conditioned medium* dengan matrigel menurun 0,25 kali dibandingkan dengan kontrol yaitu sel yang ditanam pada *conditioned medium* (Gambar 4.6).

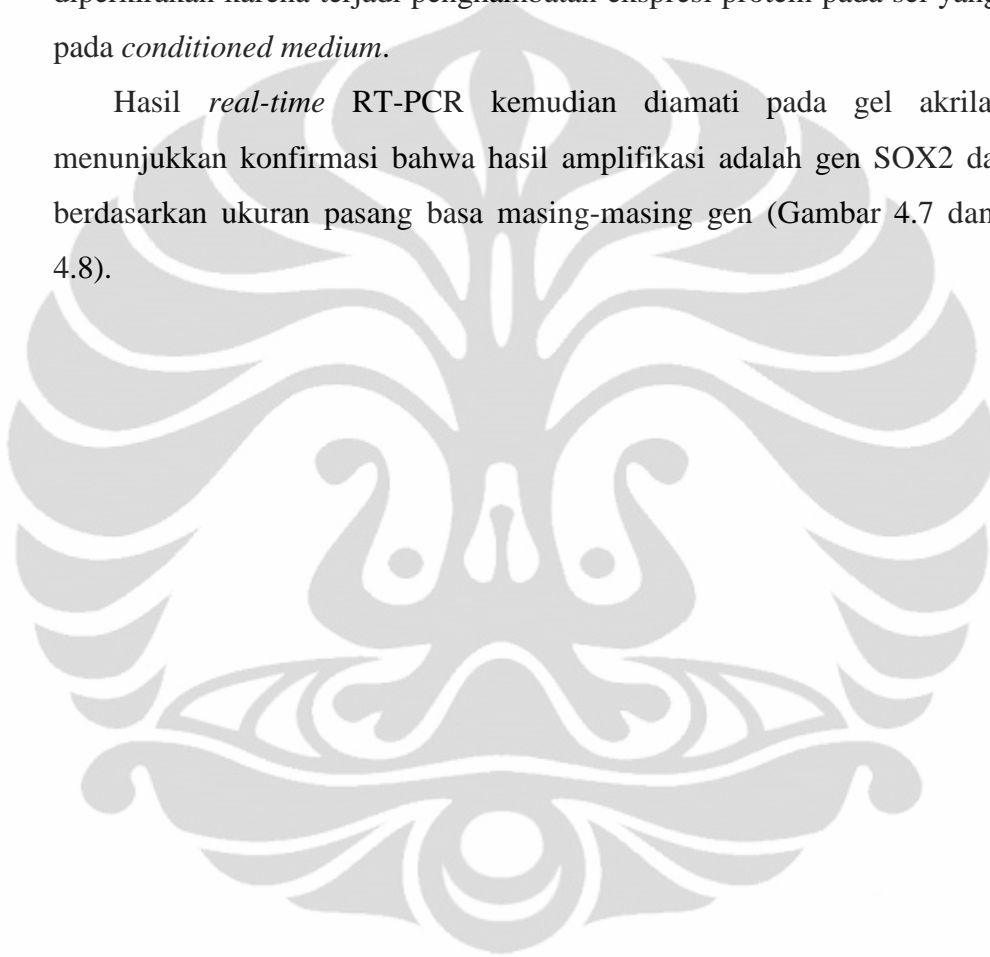
Dari hasil pengukuran level ekspresi gen SOX2 dengan *real-time* RT-PCR dan dengan normalisasi menggunakan PUM1 sebagai kontrol internal, terlihat bahwa tidak semua sel yang dikultur dengan penambahan matrigel mampu mempertahankan pluripotensi. Kemampuan matrigel untuk mempertahankan pluripotensi bergantung pada kombinasi medium yang digunakan dan sel yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel menunjukkan hasil pengukuran level ekspresi gen SOX2 tertinggi, diikuti dengan sampel yang ditanam didalam DMEM *high glucose* dengan matrigel dan *conditioned medium* dengan matrigel.

Hal ini berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Chunhui Xu., et al (2001), yang menunjukkan bahwa sel yang dikultur menggunakan *conditioned medium* dengan matrigel mampu mempertahankan pluripotensi sel punca. Kurang optimalnya kondisi *conditioned medium* yang digunakan pada penelitian ini karena pada kultur MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*), yang merupakan sumber *conditioned medium*, tidak diberikan mitomisin ataupun dilakukan iradiasi untuk menginaktivasi MEF adalah kemungkinan besar penyebab hasil penelitian menunjukkan hasil yang berbeda. Tidak dilakukannya inaktivasi memungkinkan MEF mensekresikan zat-zat yang tidak sesuai dengan kebutuhan pertumbuhan sel punca. Mallon et al. (2006) menyatakan bahwa CM mengandung *growth factor* dan molekul lainnya yang jenis dan konsentrasinya tidak diketahui secara pasti, oleh karena itu hasilnya akan bervariasi.

Pada hasil pengukuran level ekspresi gen SOX2 menggunakan *real-time* RT-PCR, level ekspresi gen SOX2 dari sel yang dikultur dalam *conditioned medium*

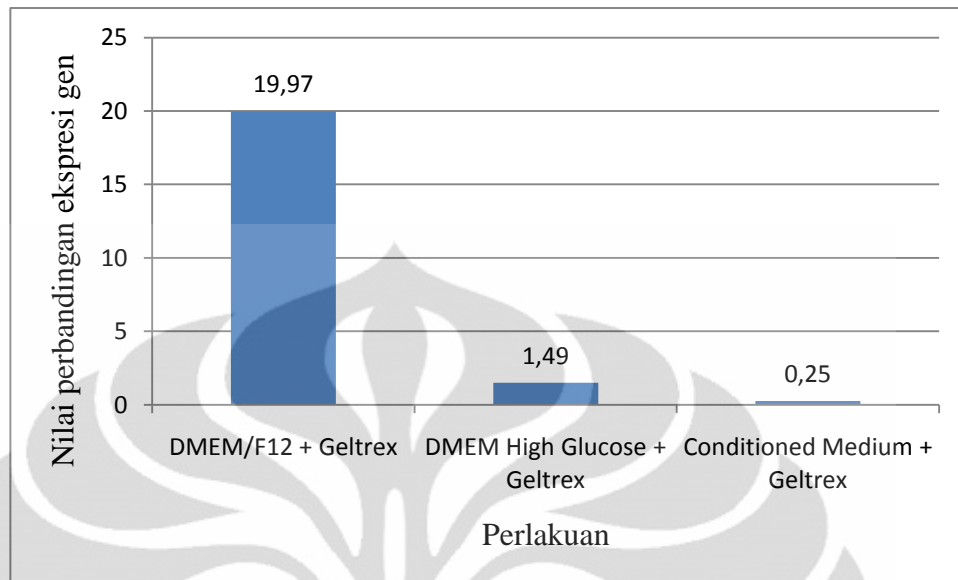
lebih tinggi dibandingkan sel yang dikultuur dalam *conditioned medium* dengan matrigel, tetapi pada pengukuran dengan spektroflluoremetri sel yang dikultuur dalam *conditioned medium* dengan matrigel menunjukkan ekspresi penanda permukaan sel punca kanker payudara yang lebih tinggi. Hal ini terjadi diperkirakan karena terjadi penghambatan ekspresi protein pada sel yang dikultuur pada *conditioned medium*.

Hasil *real-time* RT-PCR kemudian diamati pada gel akrilamid 8% menunjukkan konfirmasi bahwa hasil amplifikasi adalah gen SOX2 dan PUM1 berdasarkan ukuran pasang basa masing-masing gen (Gambar 4.7 dan Gambar 4.8).

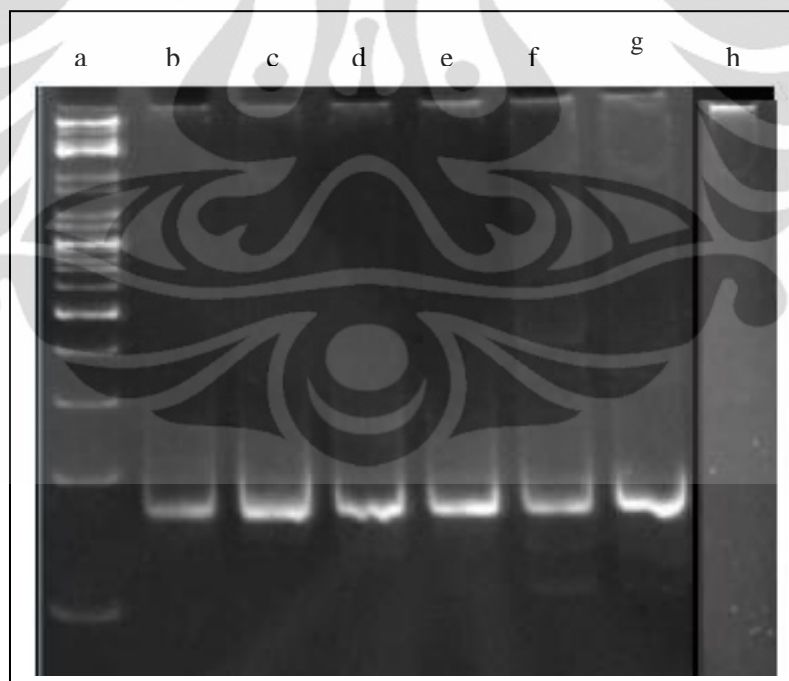


Tabel 4.4. Hasil pengukuran ekspresi SOX2 dan PUM1 dengan *real-time* RT-PCR

No	Perlakuan	Ct SOX2	Ct PUM1	$\Delta C_T = C_T \text{ control} - C_T \text{ perlakuan}$		$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$
				SOX2	PUM1		
1	DMEM/F12 + matrigel	29,67	35,67	32,335-	34,245-	-4,085	19,97
		29,91	35,90	29,79= 2,545	35,785= -1,54		
2	DMEM/F12	32,11	33,44				
		32,56	35,05				
3	DMEM <i>High</i> <i>glucose</i> + matrigel	29,01	35,67	29,33-	35,565-	-0,575	1,49
		29,38	36,34	29,195= 0,135	36,005= -0,44		
4	DMEM <i>High</i> <i>glucose</i>	29,29	35,24				
		29,37	35,89				
5	<i>Conditioned</i> <i>medium</i> + matrigel	29,69	39,03	28,56-	39,85-	2,02	0,25
		29,83	-	29,76= -1,2	39,03= 0,82		
6	<i>Conditioned</i> <i>medium</i>	28,52	39,85				
		28,60	-				



Gambar 4.6. Kurva hasil normalisasi SOX2 dengan PUM1 pada pengukuran dengan *real-time* RT-PCR



Gambar 4.7. Hasil *real-time* RT-PCR gen SOX2 pada elektroforesis akrilamid 8%
 a. Marker; b. CM; c. CM + matrigel; d. DMEM *high glucose*; e. DMEM *high glucose* + matrigel; f. DMEM/F12; g. DMEM/F12 + matrigel; h. kontrol negatif



Gambar 4.8. Hasil *real-time* RT-PCR gen PUM1 pada elektroforesis akrilamid 8%; a. Marker; b. CM; c. CM + matrigel; d. DMEM *high glucose*; e. DMEM *high glucose* + matrigel; f. DMEM/F12; g. DMEM/F12 + matrigel

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Penambahan matrigel ke dalam medium tidak selalu dapat mempertahankan pluripotensi sel punca dan kombinasi DMEM/F12 dengan matrigel merupakan kondisi kultur terbaik untuk mempertahankan pluripotensi sel punca kanker payudara.
2. Nilai perbandingan jumlah sel yang tidak mengekspresikan penanda permukaan CD24 namun mengekspresikan penanda permukaan CD44 pada sel yang dikultur dengan penambahan matrigel lebih tinggi dibandingkan dengan sel yang dikultur tanpa penambahan matrigel. Sedangkan, berdasarkan level ekspresi SOX2 yang diukur menggunakan metode *real-time* RT-PCR menunjukkan bahwa sel yang dikultur dengan matrigel menunjukkan peningkatan ekspresi gen SOX2 kecuali sel yang dikultur dalam *conditioned medium* dengan matrigel menunjukkan penurunan ekspresi gen.
3. Nilai perbandingan jumlah sel yang tidak mengekspresikan penanda permukaan CD24 namun mengekspresikan penanda permukaan CD44 pada sel yang dikultur dalam DMEM/F12 dengan matrigel memiliki nilai tertinggi dan berdasarkan level ekspresi gen SOX2 yang diukur menggunakan *real-time* RT-PCR menunjukkan bahwa sel yang dikultur dengan DMEM/F12 dengan matrigel memiliki peningkatan level ekspresi SOX2 tertinggi.

5.1 Saran

1. Untuk mendapatkan amplifikasi yang lebih spesifik perlu dilakukan optimasi dengan menggunakan alat *real-time* PCR yang digunakan.
2. Untuk mendapatkan level ekspresi gen yang lebih akurat perlu dilakukan pengukuran level RNA menggunakan *real-time* RT-PCR secara triplo atau lebih.

3. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut tentang kandungan *conditioned medium* dan dilakukan optimasi yang lebih baik terhadap kualitas *conditioned medium* yang digunakan.



DAFTAR ACUAN

- 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.
- American Cancer Society. (2007). *Cancer Facts and Figure 2007*. Atlanta: American Cancer Society.
- Application Manual*. (1995). Germany: Boehringer Mannheim GmbH Biochemical.
- Aruffo, A., Stamenkovic, M. Melnick., Underhill, C.B., Seed, B. (1990). CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 61, 1303-1313.
- Ausubel, F.M. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Azamris., Arif, Wirisma., Darwin, Eriyati. (2003). Ekspresi CD44 pada jaringan tumor karsinoma payudara. *Cermin Dunia Kedokteran*. 139, 27-33.
- Biorad iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR[®] Green Protocol*. (2000). California: Biorad Laboratories.
- Bloom dan Fawcett, Don W. (1994). *Buku Ajar Histologi* (Edisi 12) (dr. Jan Tambayong, Penerjemah). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Bongso, Ariff dan Eng Hin Lee. (2005). *Stem cells : from bench to bedside*. Singapore : World Scientific Publishing.
- Boyer, R. (2000). *Modern Experimental Biochemistry* (Ed. ke-3). California: Addison Wesley Longman, Inc.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problem. *J. Mol. Endocrinol*. 29, 23-39.
- Bustin, S.A. dan Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantification Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. Biomol. Techniques*. 15, 3, 155-166.

- Chunhui Xu., Inokuma, Margaret S., Denham, Jerrod., Golds, Kathaleen., Kundu, Pratima., Gold, Joseph D., dan Carpenter, Melissa K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19, 971–974.
- Chunhui Xu., Rosler, Elen., Jianjie Jiang., Lebkowski, Jane S., Gold, Joseph D., O’Sullivan, Chris., Delavan-Boorsma, Karen., Mok, Michael., Bronstein, Adrienne., Carpenter, Melissa K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth factor without conditioned medium. *Stem Cells*, 23, 315-323.
- Dellis, S. (2009). Molecular lab experiment molecular biology. Restriction digest, gel electrophoresis, and DNA ligation. 22 hlm.
<http://dellis.people.corf.edu/biol312L/virtualbook.html>.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2007). *Profil kesehatan Indonesia 2005*. Jakarta: Depkes RI.
- 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.
- Fairbanks, D.J. dan W.R. Andersen. (1999). *Genetics: The continuity of life*. Toronto: Brooks/Cole Publishing Company.
- Farrell, R.E. (2010). *RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization* (4th ed). New York: Elsevier.
- Franks, F. (1993). *Protein Biotechnology*. US: The Humana Press Inc.
- Gale, T. (2005). Housekeeping Genes. *Dalam: Gale, Thomas. World of Genetics*. US: Thomas Corporation.
- Gallagher, S.R. (1995). One-dimentional SDS gel electrophoresis protein. Dalam: Coligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher dan P.T. Wingfield (Ed). 2003. *Current protocols in protein science*. Washington: John Willey & Sons.
- Gilbert, S.F. (2006). *Developmental Biology* (Ed. ke-8). US: Sinauer Association, Inc.
- Ginestier, C. (2007). ALDH1 is a Marker of Normal and Malignant Breast Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell*. 555-567.

- Goldsby, R. A. (1992). *Kuby immunology* 4th edition. USA: W.H. Freeman and Co.
- Handojo, I. (2003). *Pengantar imunoasai dasar*. Surabaya: Airlangga University Press.
- H. Fong, K. A. Hohenstein, dan P. J. Donovan. (2008). Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 1931–1938.
- Hall, T.A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* [Computer Software]. USA : Isis Pharmaceuticals.
- Hod, Y. (1992). A Simplified Ribonuclease Protection Assay. *Biotechniques*. 13, 852-854.
- Hugget, J., Dheda, K., Bustin, S. dan Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 1–6.
- Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia. (n.d.a.). Material and methods: culture cells. Jakarta: IHVCB-UI.
- Invitrogen. (2009). Geltrex™ reduced growth factor basement membrane matrix. USA: Invitrogen Corp.
- Kazuharu Kai, Yoshimi Arima, Toshio Kamiya, Hideyuki Saya. (2009). Breast cancer stem cell. *Breast Cancer*. 17, 80-85.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., dan Kondoh, H. (2000). Pairing SOX Off: with Partners in The Regulation of Embryonic Development. *Trends Genet*. 16, 182-187.
- Kirschstein, R. dan Skirboll, L.R. (2001). *Stem Cells : Scientific progress and future research directions*. Washington: National Institute of Health.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., dan Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0 [Computer Software]. UK : The Conway Institute of Biomolecular and Biomedical Research, University College Dublin.
- Life Sciences Learning Center. (2009). *Stem Cells: Teacher Information*. New York: University of Rochester.

- Livak, Kenneth J. dan Schmittgen, Thomas D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS*. 25, 402–408.
- 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.
- Mallon, Barbara S., Kye-Yoon Park, Chen, Kevin G., Hamilton, Rebecca S., McKay, Ronald D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 1063 – 1075.
- McNeill, R.E., Miller, N., dan Kerin, M.J. (2007). Evaluation and Validation of Candidate Endogenous Control Genes for Real-Time Quantitative PCR Studies of Breast Cancer. *BMC Mol. Biol.* 8, 107.
- McPherson, M. dan Moller, S. (2006). *PCR: The Basics* (Ed. ke-2). UK: Taylor and Francis Group.
- Mei, Z. dan Rosen, J.M. (2006). Stem cells in the etiology and treatment of cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 60-64.
- Moffat, C.A., Osselton, M.D., dan Widdop, B. (2005). *Clarke's analysis of drugs and poisons, in pharmaceuticals, body fluids, and postmortem material* (3rd ed). London: Pharmaceutical Press.
- Motari, E., Xincheng Zheng., Xiaodan Su., Yang Liu., Kvaratskhelia, Mamuka., Freitas, Michael., Peng George Wang. (2009). Analysis of recombinant CD24 glycans by MALDI-TOF-MS reveals prevalence of sialyl-T antigen. *American Journal of Biomedical Science*, 1, 1-11.
- Nafrialdi dan Sulistia Gan. (2007). Antikanker. Dalam: Sulistia G. Ganiswara (Ed.). *Farmakologi dan terapi*. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI.
- NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual*. (2009). Delaware: Thermo Fisher Scientific.
- National Center of Biotechnology Information. (2010). PUM1 pumilio homolog 1 (Drosophila). Available at: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698. 28 Desember 2010.
- National Center of Biotechnology Information. (2010). SOX2 human. Available at:

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657. 28 Desember 2010.

National Institute of Health. (2007). Stem Cell information : The national institute of health resource for stem cell research.

<http://stemcells.nih.gov/info/basic/basics1.asp>

Ocana, Oscar H., dan Nieto, M Angela. (2010). Epithelial plasticity, stemness and pluripotency. *Cell Research*. 20, 1086-1088.

Ornella, Aulia. (2010). *Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Oscar Gee-Wan Wong. (2010). Hypermethylation of SOX2 Promoter in Endometrial Carcinogenesis. *Obstetrics and Gynecology International*, 2010, Article ID 682504.

Parker, R.M. dan Barnes, N.M. (1999). mRNA: Detection by *In Situ* and Northern Hybridization. *Methods Mol. Biol.* 106, 247-283.

Pazdur, R., Wagman, L.D., Champhausen, K.A., Hoskins, W.J. (2008). *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach : Medical, Surgical, & Radiation Oncology* (Ed. ke-11). New York : Cmp United Business Media.

Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook. (2008). US: Qiagen Group.

Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh. (2006). California: Biorad Laboratories.

Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L., Peyrat, J.P. (2000). Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *Eur J. Cancer*. 36, 1038-1042.

Reya, Tannishtha., Morrison, Sean J., Clarke, Michael F., dan Weissman, Irving L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 414, 105-111.

RNeasy Mini Handbook (Fourth Edition). (2010). USA: Qiagen Group.

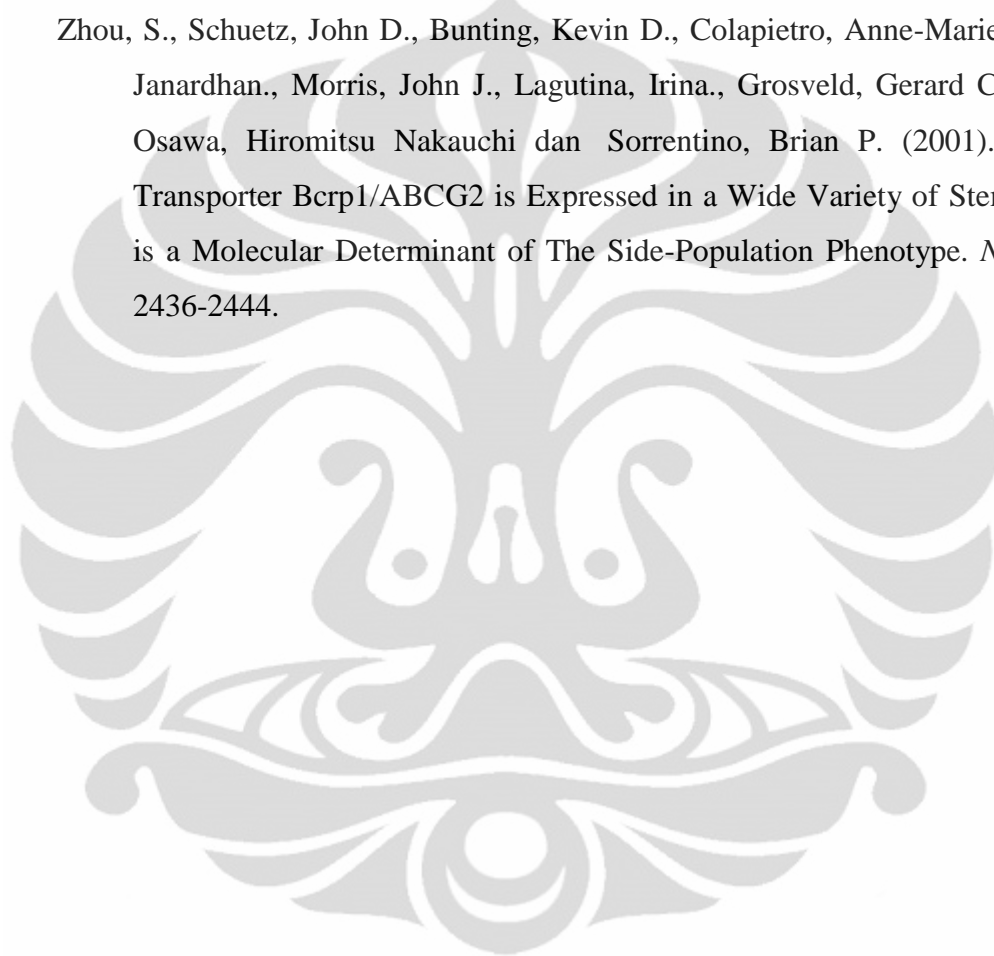
Rodriguez-Pinilla, S.M., Sarrio, D., Moreno-Bueno, G. Rodriguez-Gil, Y., Martinez, M.A., Hernandez, L., Hardisson, D., Reis-Filho, J.S., Palacios, J. (2007). SOX2: A possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Modern Pathol.* 20, 474-481.

Sagar, Jayesh., Chaib, Boussad., Sales, Kevin., Winslet, Marc., dan Seifalian, Alexander. (2007). Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells:

- a review. *Cancer Cell International*. 2007, 7:9.
<http://www.cancerci.com/content/7/1/9>.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Ed. ke-2). NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. dan D.W. Russel. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 1* (Ed. ke-3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook, J. dan D.W. Russel (b). (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 2* (Ed. ke-3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Saputra, Virgi. (2006). Dasar-dasar *stem cell* dan potensi aplikasinya dalam ilmu kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*. 153, 21-25.
- Sauer, M., Hofkens, J., Enderlein, J. (2011). *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging*. Weinheim: Verlag GmbH & Co.
- Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (n.d.). *Jika tidak dikendalikan 26 juta orang di dunia menderita kanker*. 30 Mei 2011
<http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-orang-di-dunia-menderita-kanker.html>
- Song, L.L. dan Miele, L. (2007). Cancer Stem Cells--an Old Idea That's New Again: Implications for The Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Exp. Opin. Biol. Ther.* 7, 431-438.
- Surya, Endang. (2010). Stem Cell dan Potensinya dalam Dunia Riset dan Aplikasi Klinis. *Medical Era*.
- Szabo, Aniko., Perou, Charles M., Karaca, Mehmet., Perreard, Laurent., Quackenbush, John F., Bernard, Philip S. (2004). Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biology* 2004, 5:R59.
- Tang, C., Beng, T.A., dan Shazib, P. (2007). Cancer Stem Cell: Target for Anti-Cancer Therapy. *Faseb J.* 21, 3777-3778.
- Takahashi, K. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131, 5, 861-872.
- Turnpenny, Peter., dan Ellard, Sian. (2007). *Elements of Medical Genetics*. China: Elsevier Limited. 196, 210.
- Tortora, Gerard J., dan Derrickson, Bryan H. (2009). *Principles of Anatomy and Physiology: Maintenance and Continuity of The Human Body* (Twelfth

- Edition, Volume 2). Asia: John Wiley and Sons, Inc. 1110-1111.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 7, 34.1-34.11.
- Walker, J.M., dan Rapley, R. (2000). *Molecular Biology and Biotechnology* (Ed. ke-4). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Watson, David G. (2005). *Analisis farmasi: Buku ajar untuk mahasiswa farmasi dan praktisi kimia farmasi* (Ed. Ke-2) (Winny R. Syarif, S.Si, Apt, Penerjemah). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Weis, J.H., Tan, S.S., Martin, B.K., Wittwer, C.T. (1992). Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet.* 8, 263-264.
- Weiss, Samuel., Dunne, Christine., Hewson, Jennifer., Wohl, Cheryl., Wheatley, Matt, Peterson, Alan C., dan Reynolds, Brent A. (1996). Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci*, 16, 7599–7609.
- Wilfinger, W.W., Mackey, M., dan Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on The Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques.* 22, 474.
- Wilson, M. dan Koopman, P. (2002). *Matching SOX: Partner Proteins and Co-factors of the SOX Family of Transcriptional Regulators.* *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 441-446.
- World Health Organization. (2006). Screening for Breast Cancer. Available at: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>
- Yamamura K., MC, Kibbey., Jun SH., dan HK, Kleinman. (1993). Effect of matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 4, 259 – 265.
- Yanxia Liu, Zhihua Song, Yang Zhao, Han Qin, Jun Cai, Hong Zhang, Tianxin Yu, Siming Jiang, Guangwen Wang, Mingxiao Ding, Hongkui Deng. (2006). A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 346, 131 – 139.

- Yuan, Joshua S., Reed, Ann., Feng Chen., dan Stewart, C. Neal, Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 2006, 7:85.
- Yupeng Chen, Lei Shi, Lirong Zhang, Ruifang Li, Jing Liang, Wenhua Yu, Luyang Sun, Xiaohan Yang, Yan Wang, Yu Zhang, dan Yongfeng Shang. (2008). The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J. Bio. Chem.* 283, 26, 17969–17978.
- Zhou, S., Schuetz, John D., Bunting, Kevin D., Colapietro, Anne-Marie., Sampath, Janardhan., Morris, John J., Lagutina, Irina., Grosveld, Gerard C., Mitsujiro Osawa, Hiromitsu Nakauchi dan Sorrentino, Brian P. (2001). The ABC Transporter Bcrp1/ABCG2 is Expressed in a Wide Variety of Stem Cells and is a Molecular Determinant of The Side-Population Phenotype. *Nat. Med.* 7, 2436-2444.

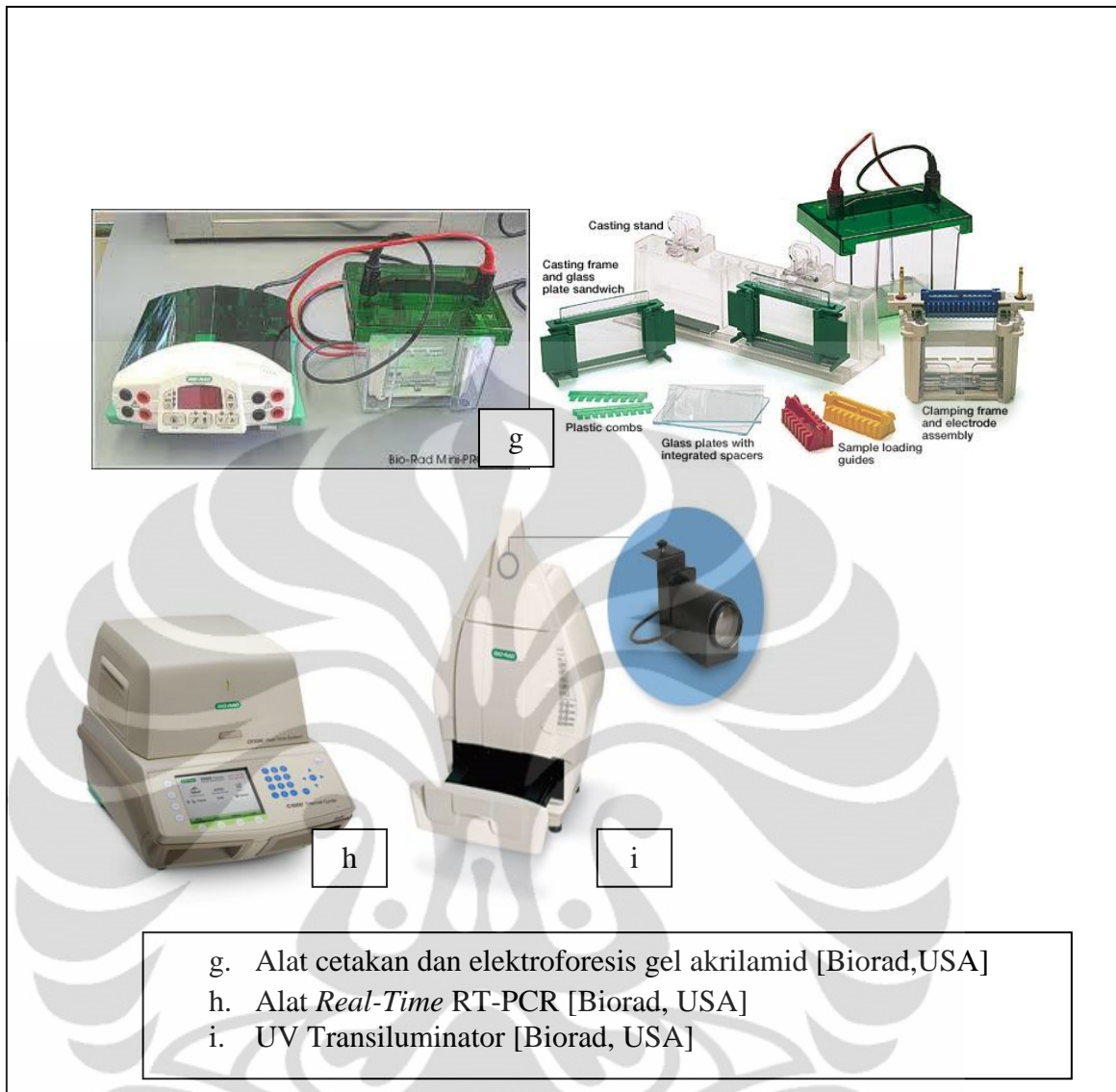




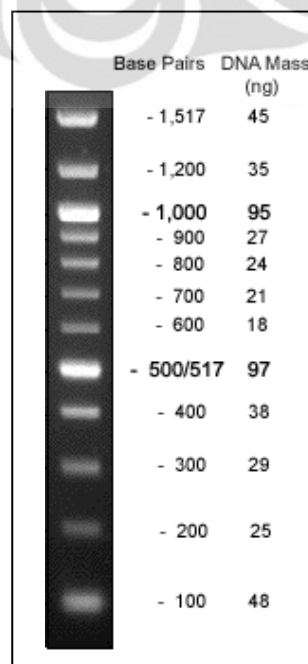
GAMBAR



Gambar 4.9. Gambar Alat yang Digunakan dalam Penelitian

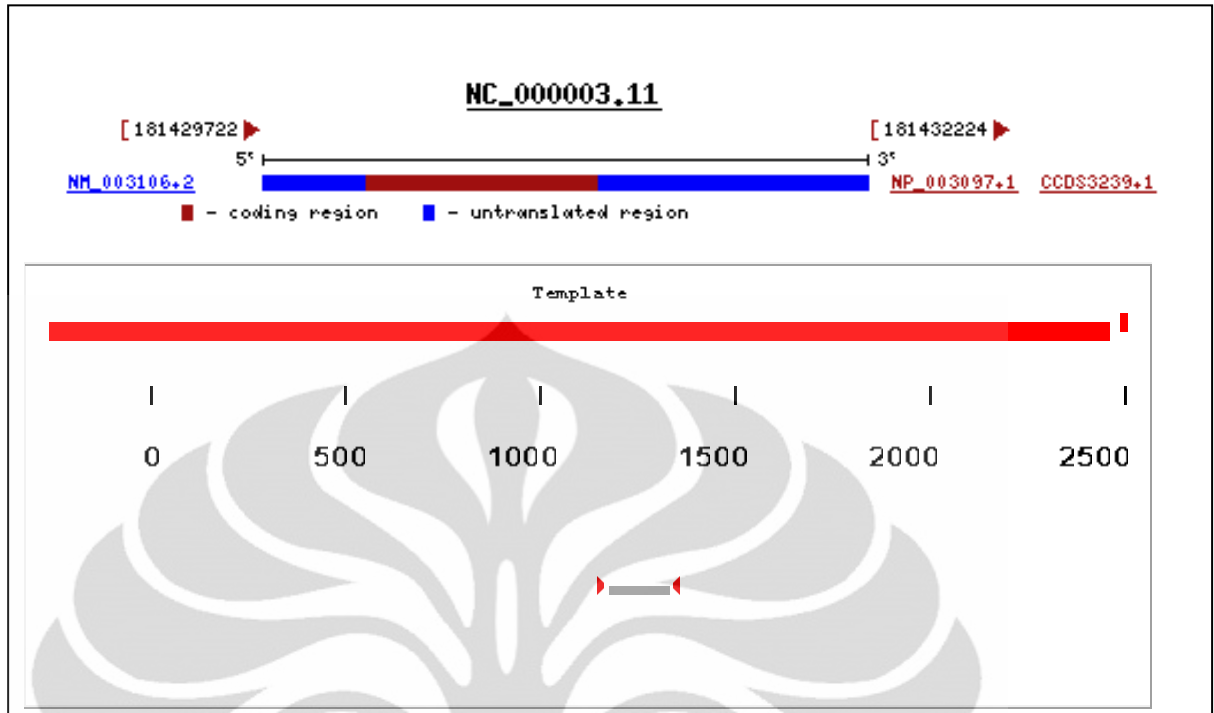


Gambar 4.10. Gambar Alat yang Digunakan dalam Penelitian

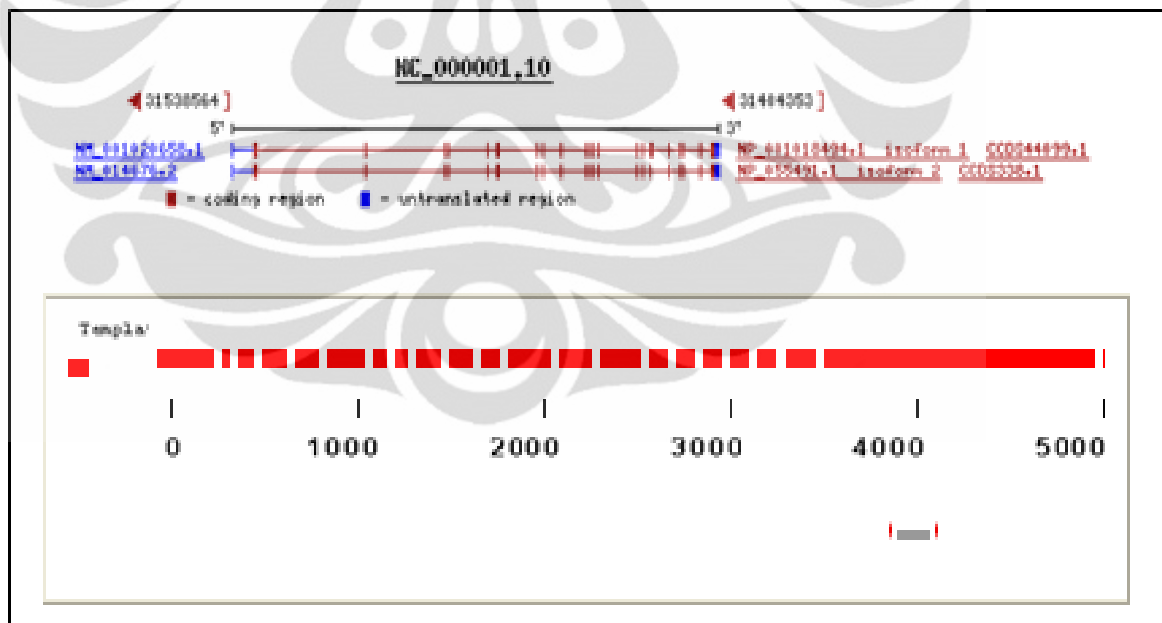


Gambar 4.11. Penanda 100 bp [New England Biolabs, UK]

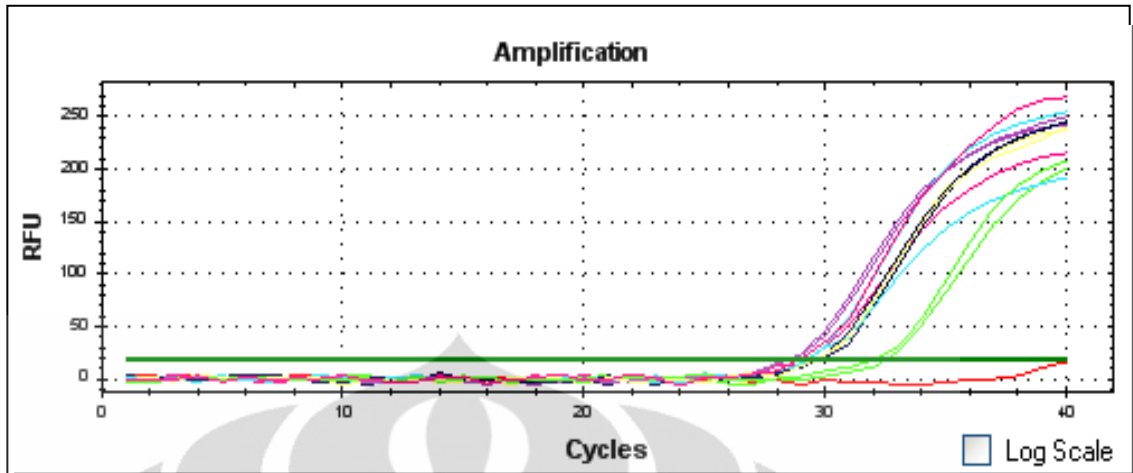
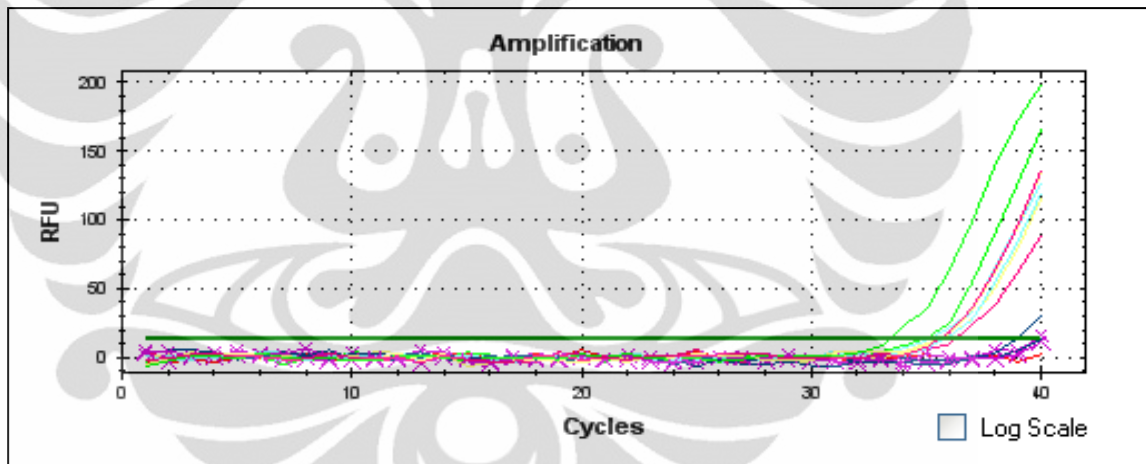
Penambahan matrigel ..., Annisa Nooryani, FMIPA UI, 2011



Gambar 4.12. Posisi desain primer SOX2



Gambar 4.13. Posisi desain primer PUM1

Gambar 4. 14. Kurva SOX2 *real-time* RT-PCRGambar 4.15. Kurva PUM1 *real-time* RT-PCR



TABEL

Tabel 3.1. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses RT-PCR

Komposisi	Volume	Konsentrasi Akhir
Air bebas nuklease	1,65 μ l	-
5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer	2 μ l	1x
Qsolution	2 μ l	-
Primer Forward (20 μ M/ μ l)	0,6 μ l	1,2 μ M
Primer Reverse (20 μ M/ μ l)	0,6 μ l	1,2 μ M
dNTP mix (masing-masing nukleotida 10 mM)	0,4 μ l	400 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	0,25 μ l	0,625 mM
RNAse Inhibitor (50 unit/ μ l)	0,1 μ l	-
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,4 μ l	-
RNA cetakan	2 μ l	1,74 ng/ μ l
Volume akhir	10 μ l	

[Sumber: Qiagen *OneStep RT-PCR Kit Handbook*, 2008]

Tabel 3.2. 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' CAGCGCATGGACAGTTA C-3'	18	50,69	55,56	900	917
	SOX2 R 5' -CATGGAGTTGTACTGCA GG-3' Panjang amplikon 168	19	49,94	52,63	1067	1049
2	PUM1 F (NM_001020658.1) 5'- TGAGGTGTGCACCATGAA C-3'	19	52,23	52,63	3416	3434
	PUM1 R 5'- CAGAATGTGCTTGCCATAG G-3' Panjang amplikon 187	20	51,13	50,00	3602	3583

[Sumber: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]

Tabel 3.3. Isi dari komponen iScript™ *One-Step* RT-PCR Kit

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

[Sumber: Biorad iScript *One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green Protocol*, 2000]

Tabel 3.4. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses *Real-Time RT-PCR*

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

[Sumber: Biorad *iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green Protocol*, 2000]

Tabel 4.5. Hasil pengukuran CD24⁺ dengan spektrofлуorometri

Background (Bg) : 1,400

Perlakuan	Kontrol	A	B	C	D	E	F
Absorbansi (A1)	2.27	6.09	7.90	6.37	7.07	6.53	6.92
Absorbansi (A2)	2.26	6.19	7.40	6.43	6.86	6.49	6.30
Absorbansi (A3)	2.17	6.44	9.14	6.69	6.98	6.59	6.91
A1-Bg	0.87	4.69	6.50	4.97	5.67	5.13	6.92
A2-Bg	0.86	4.79	7.74	5.03	5.46	5.09	6.30
A3-Bg	0.77	5.04	7.74	5.29	5.58	5.19	6.91
Rata-rata (Ax-Bg)	0.83	4.84	7.32	5.10	5.57	5.14	6.71
Rata-rata Kontrol	2.23						
A1-rata2 kontrol	-1.36	2.46	4.27	2.74	3.44	2.90	4.69
A2-rata2 kontrol	-1.37	2.56	5.51	2.8	3.23	2.86	4.07
A3-rata2 kontrol	-1.46	2.81	5.51	3.06	3.35	2.96	4.68
Rata2 (Ax - rata2 kontrol)	-1.39	2.61	5.10	2.87	3.34	2.91	4.48

Keterangan:

A = DMEM/F12 + Matrigel

B = DMEM/F12

C = DMEM *High Glucose* + Matrigel

D = DMEM *High Glucose*

E = *Conditioned Medium* + Matrigel

F = *Conditioned Medium*

Tabel 4.6. Hasil pengukuran CD44⁺ dengan spektrofotometri

Background (Bg) : 0,369

Perlakuan	Kontrol	A	B	C	D	E	F
Absorbansi (A1)	1.44	22.47	10.36	12.23	8.20	9.13	10.35
Absorbansi (A2)	1.88	21.08	10.06	11.29	8.63	9.36	10.45
Absorbansi (A3)	1.19	19.37	11.36	10.33	8.67	10.19	10.84
A1-Bg	1.07	22.10	9.99	11.86	7.83	8.76	10.35
A2-Bg	1.51	20.72	10.99	10.92	8.26	8.99	10.45
A3-Bg	0.83	19.00	10.99	9.96	8.30	9.82	10.84
Rata-rata (Ax-Bg)	1.14	20.60	10.66	10.91	8.13	9.19	10.54
Rata-rata Kontrol	1.51						
A1-rata2 kontrol	-0.44	20.59	8.48	10.35	6.32	7.25	8.84
A2-rata2 kontrol	0.00	19.21	9.48	9.41	6.75	7.48	8.94
A3-rata2 kontrol	-0,68	17.49	9.48	8.45	6.79	8.31	9.33
Rata2 (Ax - rata2 kontrol)	0.37	19.10	9.15	9.40	6.62	7.68	9.04

Keterangan:

A = DMEM/F12 + Matrigel

B = DMEM/F12

C = DMEM *High Glucose* + Matrigel

D = DMEM *High Glucose*

E = *Conditioned Medium* + Matrigel

F = *Conditioned Medium*

Tabel 4.7. Perhitungan Konsentrasi RNA untuk Real-Time RT-PCR

No	Perlakuan	Konsentrasi RNA (ng/ μ l)	Perhitungan Konsentrasi Akhir
1.	DMEM/F12 + matrigel	44,93	$44,93 \text{ ng}/\mu\text{l} \times A \mu\text{l} = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$ $A = 0,62 \mu\text{l}$ Air = 9,88 μ l
2.	DMEM/F12	125,3	(1) $125,3 \text{ ng}/\mu\text{l} \times B \mu\text{l} = 20 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 10 \mu\text{l}$ $B = 1,59 \mu\text{l}$ Air = 8,41 μ l (2) $125,3 \text{ ng}/\mu\text{l} \times B' \mu\text{l} = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$ $B' = 1,39 \mu\text{l}$ Air = 9,11 μ l
3.	DMEM <i>high</i> <i>glucose</i> + matrigel	20,3	$20,3 \text{ ng}/\mu\text{l} \times C \mu\text{l} = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$ $C = 1,37 \mu\text{l}$ Air = 9,13 μ l
4.	DMEM <i>high</i> <i>glucose</i>	20,97	$20,97 \text{ ng}/\mu\text{l} \times D \mu\text{l} = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$ $D = 1,32 \mu\text{l}$ Air = 9,18 μ l
5.	<i>Conditioned</i> <i>medium</i> + matrigel	8,93	$8,93 \text{ ng}/\mu\text{l} \times E \mu\text{l} = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 25 \mu\text{l}$ $E = 3,104 \mu\text{l}$ Air = 7,396 μ l
6.	<i>Conditioned</i> <i>medium</i>	6,93	$6,93 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 4 \mu\text{l} = X \times 25 \mu\text{l}$ $X = 1,1088 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Air = 7 μ l



Lampiran 1. Komposisi DMEM/F12 (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)

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 glutamat	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

(lanjutan)

Komposisi	Konsentrasi
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
Natrium fosfat dibasic (Na ₂ HPO ₄) anhidrat	71,02
Natrium fosfat monobasic (NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	62,5

(lanjutan)

Komposisi	Konsentrasi
Zinc sulfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,432
Komponen lain	
D-Glukosa	3151
Hipoxantin Na	2,39
Asam linoleat	0,042
Putrescine 2HCl	0,081
Natrium piruvat	55
Thymidine	0,365

Lampiran 2. Komposisi DMEM *High Glucose*

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

(lanjutan)

Komposisi	Konsentrasi
Garam anorganik	
Kalium klorida anhidrat	200
Ferri nitrat	0,1
Magnesium sulfat anhidrat	97,67
Kalium klorida	400
Natrium klorida	6400
Natrium fosfat	125
Komponen Lain	
D-glukosa	4500
Fenol merah	15
Natrium piruvat	110

Lampiran 3. 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 : *tg6* /PT02.FK/ETIK/2009

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL — CLEARANCE

Panitia Tetap Penilai Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:
The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine, University of Indonesia, with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled:

“Analisis pluripotensi dan ekspresi Manganese-Superoxide Dismutase (MnSOD) pada sel punca kanker payudara”.

Peneliti Utama : *Dr.rer.physiol dr.Septelia Inawati Wanandi*
Name of the principal investigator

Nama Institusi : *Biokimia dan Biologi Molekular FKUI*

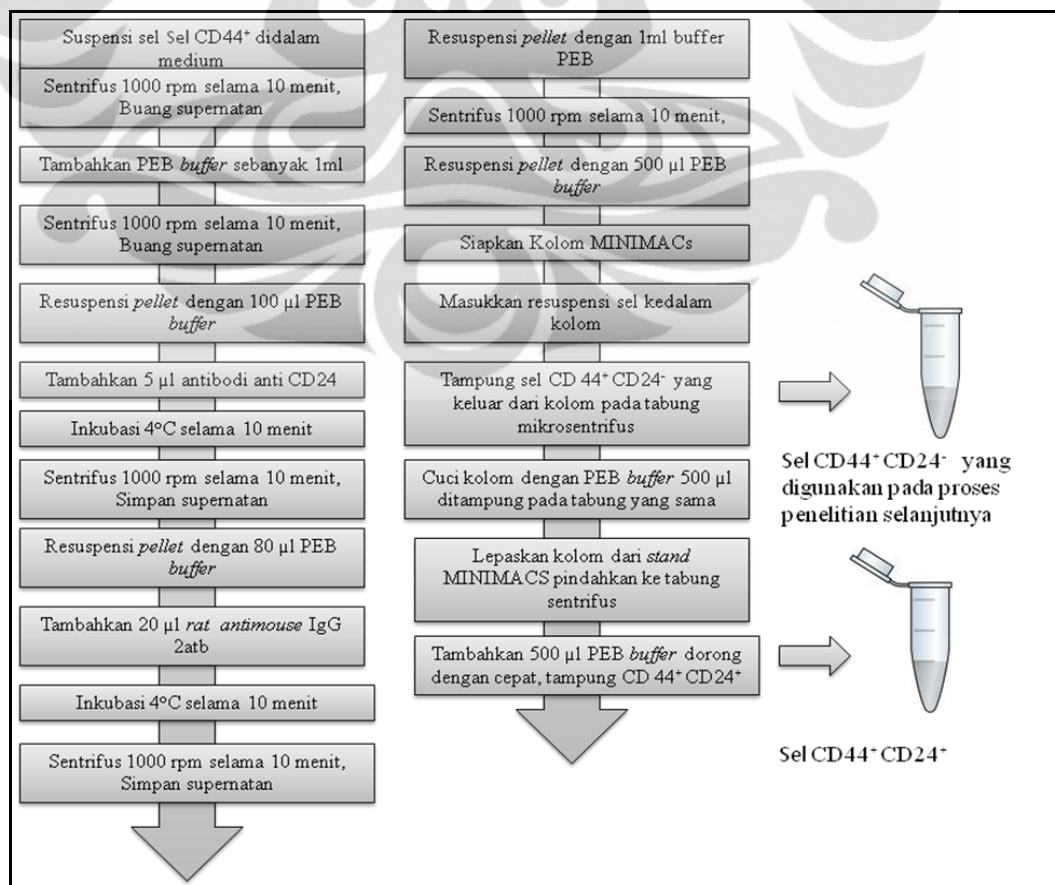
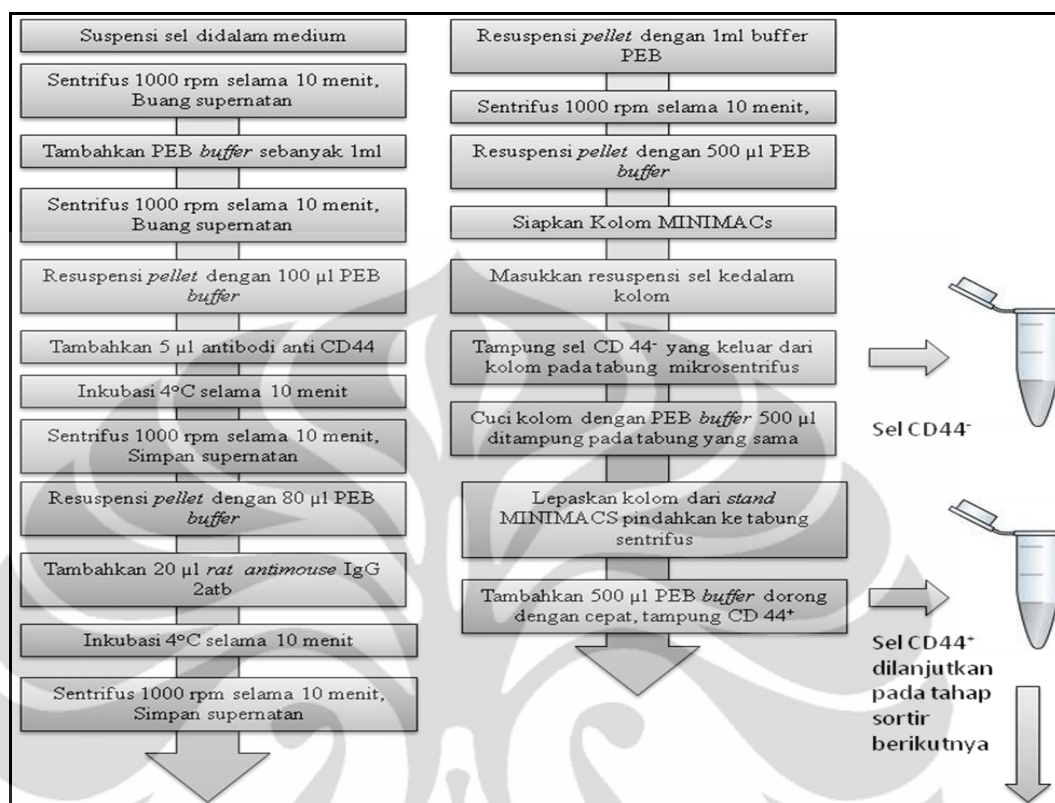
dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, 25 Mei 2009




Chairman
Ketua
Prof. Dr. Dr. Agus Firmansyah, SpA(K)


-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

Lampiran 4. Skema proses sortir sel dengan MINIMACs *cells separator*


Lampiran 5. Spesifikasi Primer SOX2

EUROGENTEC AIT		Customer:	
 EUROGENTEC AIT <small>EST. 2004</small> 26 Ayer Rajah Crescent #07-10 Singapore 139944 Tel: +65 6778 6822 Fax: +65 6778 2962 Email: oligos@aitbiotech.com		Budiman Indonesia AIT6929 07/08/2009 Remarks:	
Oligo Name: Sox2mid-463F 5'CAGCGCATGGACAGTTAC3'		Oligo Number: 55004	
Delivered: 13 OD 431 ug 78.24 nmol Conc.: 782ul to 100 uM	No. Bases: 18 MW: 5509 Tm: 45.2	Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MalDI-TOF	
Oligo Name: Sox2mid-630R 5'CATGGAGTTGTACTGCAGG3'		Oligo Number: 55007	
Delivered: 8 OD 276 ug 46.91 nmol Conc.: 469ul to 100 uM	No. Bases: 19 MW: 5884 Tm: 46	Synthesis Scale: 50 nmole Purification: Desalted Delivery Form: Dry Quality Control: MalDI-TOF	
Printed on: 8/12/2009 2:45:54 PM		Page 2	

Lampiran 6. Spesifikasi Primer PUM1



PT. Genetika Science Indonesia
Jln. Duri Raya No 5D, Jakarta Barat 11510,
Indonesia
Attn : Dr Budiman Bela
Telt: (62) 021-569821 37738



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

Oligonucleotide Datasheet for Dr Budiman Bela

SynthID	Oligo Name	Sequence	Mod	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 G-3'		20	50 nmole	PCR Grade	60.4	50.0	6157	16.6	200.3	33988	add 340µl of dH2O

Mixed Bases Nomenclature

N = any M = all (N, M)

I = any S = all (I, S)

B = any R = all (B, R)

Handling Procedures for Oligonucleotides

- Always aliquot oligo into your working solution to prevent contamination to your stock. Keep oligos in -20°C.
- If your oligo is delivered in wet format, it will be in the concentration as per your ordering instruction.
- When resuspending your oligo, vortex thoroughly before use.
- Always aliquot oligo into your working solution to prevent contamination to your stock. Keep oligos in -20°C.

Ordering and Technical Support

Ordering: order@genetika.com
 Technical Support: support@genetika.com
 Orders received after 5pm (SAT - 8) will be processed the next working day.

Page 1 of 1

Lampiran 7. Pemeriksaan BLAST Nukleotida

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      CAGAAATGTGCTTGCCATAGG  20
          |||
Sbjct 3602   CAGAAATGTGCTTGCCATAGG  3583

```

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

```

Lampiran 8. Posisi Primer SOX2

438 ATG TACAACATGA TGGAGACGGA GCTGAAGCCG CCGGGCCCCG
 481 AGCAAACCTC GGGGGGCGGC GGCAGCAACT CCACCGCGGC GGCAGCCGGC GGCAACCAGA
 541 AAAACAGCCC GGACCGCGTC AAGCGGCCCA TGAATGCCTT CATGGTGTGG TCCCGCGGGC
 601 AGCGGCGCAA GATGGCCCAG GAGAACCCCA AGATGCACAA CTCGGAGATC AGCAAGCGCC
 661 TGGGCGCCGA GTGGAAACTT TTGTCGGAGA CGGAGAAGCG GCCGTCATC GACGAGGCTA
 721 AGCGGCTGCG AGCGCTGCAC ATGAAGGAGC ACCCGGATTA TAAATACCGG CCCCAGCGGA
 781 AAACCAAGAC GTCATGAAG AAGGATAAGT ACACGCTGCC CGGCGGGCTG CTGGCCCCCG
 841 GCGGCAATAG CATGGCGAGC GGGGTCGGGG TGGGCGCCCG CCTGGGCGCG GCGTGAAC**C**

AGCGCATGGA CAGTTAC 3'

901 **AGCGCATGGA CAGTTAC** GCG CACATGAACG GCTGGAGCAA CGGCAGCTAC AGCATGATGC
 961 AGGACCAGCT GGGCTACCCG CAGCACCCGG GCCTCAATGC GCACGGCGCA GCGCAGATGC
 3' GG ACATCATGTT GAGGTAC 5'


1021 AGCCCATGCA CCGCTACGAC GTGAGCGCC **TGCAGTACAA CTCCATG**ACC AGCTCGCAGA
 1081 CCTACATGAA CGGCTCGCCC ACCTACAGCA TGTCCCTACTC GCAGCAGGGC ACCCCTGGCA
 1141 TGGCTCTTGG CTCCATGGGT TCGGTGGTCA AGTCCGAGGC CAGCTCCAGC CCCCCTGTGG
 1201 TTACCTCTC CTCCACTCC AGGGCGCCCT GCCAGGCCGG GGACCTCCGG GACATGATCA
 1261 GCATGTATCT CCCCAGCGCC GAGGTGCCGG AACCCGCCGC CCCCAGCAGA CTTCACATGT
 1321 CCCAGCACTA CCAGAGCGGC CCGGTGCCCC GCACGGCCAT TAACGGCACA CTGCCCTCT
 1381 CACACATGTG A


Lampiran 9. Posisi Primer PUM1

114 ATGAGCG
 121 TTGCATGTGT CTTGAAGAGA AAAGCAGTGC TTTGGCAGGA CTCTTTCAGC CCCCACCTGA
 181 AACATCACCC TCAAGAACCA GCTAATCCCA ACATGCCTGT TGTTTTGACA TCTGGAACAG
 241 GGTCGCAAGC GCAGCCACAA CCAGCTGCAA ATCAGGCTCT TGCAGCTGGG ACTCACTCCA
 301 GCCCTGTCCC AGGATCTATA GGAGTTGCAG GCCGTTCCCA GGACGACGCT ATGGTGGACT
 361 ACTTCTTTCA GAGGCAGCAT GGTGAGCAGC TTGGGGGAGG AGGAAGTGGA GGAGGCGGCT
 421 ATAATAATAG CAAACATCGA TGGCCTACTG GGGATAACAT TCATGCAGAA CATCAGGTGC
 481 GTTCCATGGA TGAAGTGAAT CATGATTTTC AAGCACTTGC TCTGGAGGGA AGAGCGATGG
 541 GAGAGCAGCT CTTGCCAGGT AAAAAGTTTT GGGAAACAGA TGAATCCAGC AAAGATGGAC
 601 CAAAAGGAAT ATTCTGGGT GATCAATGGC GAGACAGTGC CTGGGGAACA TCAGATCATT
 661 CAGTTTCCA GCCAATCATG GTGCAGAGAA GACCTGGTCA GAGTTTCCAT GTGAACAGTG
 721 AGGTCAATTC TGTACTGTCC CCACGATCGG AGAGTGGGGG ACTAGGCGTT AGCATGGTGG
 781 AGTATGTGTT GAGCTCATCC CCGGGCGATT CCTGTCTAAG AAAAGGAGGA TTTGGCCAA
 841 GGGATGCAGA CAGTGATGAA AACGACAAAG GTGAAAAGAA GAACAAGGGT ACGTTTGATG
 901 GAGATAAGCT AGGAGATTTG AAGGAGGAGG GTGATGTGAT GGACAAGACC AATGGTTTAC
 961 CAGTGCAGAA TGGGATTGAT GCAGACGTCA AAGATTTTAG CCGTACCCCT GGTAATTGCC
 1021 AGAACTCTGC TAATGAAGTG GATCTTCTGG GTCCAAACCA GAATGGTTCT GAGGGCTTAG
 1081 CCCAGCTGAC CAGCACCAAT GGTGCCAAGC CTGTGGAGGA TTTCTCCAAC ATGGAGTCCC
 1141 AGAGTGTCCC CTTGGACCCC ATGGAACATG TGGGCATGGA GCCTCTTCAG TTTGATTATT
 1201 CAGGCACGCA GGTACCTGTG GACTCAGCAG CAGCAACTGT GGGACTTTTT GACTACAATT
 1261 CTCAACAACA GCTGTTCCAA AGACCTAATG CGCTTGCTGT CCAGCAGTTG ACAGCTGCTC
 1321 AGCAGCAGCA GTATGCACTG GCAGCTGCTC ATCAGCCGCA CATCGGTTTA GCTCCCCTG
 1381 CGTTTGTC CAATCCATAC ATCATCAGCG CTGCTCCCC AGGGACGGAC CCCTACACAG
 1441 CTGGATTGGC TGCAGCAGCG AACTAGGCC CAGCTGTGGT CCCTCACCAG TATTATGGAG
 1501 TTAATCCCTG GGGAGTCTAC CCTGCCAGTC TTTTCCAGCA GCAAGCTGCC GCTGCCGCTG
 1561 CAGCAACTAA TTCAGCTAAT CAACAGACCA CCCCACAGGC TCAGCAAGGA CAGCAGCAGG
 1621 TTCTCCGTGG AGGAGCCAGC CAACGTCCTT TGACCCCAA CCAGAACCAG CAGGGACAGC
 1681 AAACGGATCC CTTGTGGCA GCTGCAGCAG TGAATTCTGC CCTTGCATTT GGACAAGGTC
 1741 TGGCAGCAGG CATGCCAGGT TATCCGGTGT TGGCTCCTGC TGCTTACTAT GACCAAAGTG
 1801 GTGCCCTTGT AGTGAATGCA GGCAGCAGAA ATGGTCTTGG AGCTCCTGTT CGACTTGTAG
 1861 CTCCTGCCCC AGTCATCATT AGTTCTCAG CTGCACAAGC AGCTGTTGCA GCAGCCGCAG
 1921 CTTAGCAAAA TGGAGCAGCT GGTGGTCTTG CTGGAACAAC AAATGGACCA TTTGCCCCTT
 1981 TAGGAACACA GCAGCCTCAG CCCCAGCCCC AGCAGCAGCC CAATAACAAC CTGGCATCCA
 2041 GTTCTTTCTA CGGCAACAAC TCTCTGAACA GCAATTCACA GAGCAGCTCC CTCTTCTCCC
 2101 AGGGCTCTGC CCAGCCTGCC AACACATCCT TGGGATTCGG AAGTAGCAGT TCTCTCGGCG
 2161 CCACCTGGG ATCCGCCCTT GGAGGGTTTG GAACAGCAGT TGCAAATCC AACACTGGCA
 2221 GTGGCTCCC CCGTGACTCC CTGACTGGCA GCAGTGACCT TTATAAGAGG ACATCGAGCA


(lanjutan)


2281 GCTTGACCCC CATTGGACAC AGTTTTTATA ACGGCCTTAG CTTTTCTCC TCTCCTGGAC
 2341 CCGTGGGCAT GCCTCTCCCT AGTCAGGGAC CAGGACATTC ACAGACACCA CCTCCTTCCC
 2401 TCTCTTACA TGGATCCTCT TCAAGCTTAA ACCTGGGAGG ACTCACGAAT GGCAGTGGAA
 2461 GATACATCTC TGCTGCTCCA GGCCTGAAG CCAAGTACCG CAGTGCAAGC AGCGCCTCCA
 2521 GCCTCTTCAG CCCGAGCAGC ACTCTTTTCT CTTCTCTCG TTTGCGATAT GGAATGTCTG
 2581 ATGTCATGCC TTCTGGCAGG AGCAGGCTTT TGGAAGATTT TCGAAACAAC CGGTACCCCA
 2641 ATTTACAAC TCGGGAGATT GCTGGACATA TAATGGAATT TTCCCAAGAC CAGCATGGGT
 2701 CCAGATTCAT TCAGCTGAAA CTGGAGCGTG CCACACCAGC TGAGCGCCAG CTTGTCTTCA
 2761 ATGAAATCCT CCAGGCTGCC TACCAACTCA TGGTGGATGT GTTTGGTAAT TACGTCATTC
 2821 AGAAGTTCTT TGAATTTGGC AGTCTTGAAC AGAAGCTGGC TTTGGCAGAA CGGATTCGAG
 2881 GCCACGTCCT GTCATTGGCA CTACAGATGT ATGGCTGCCG TGTTATCCAG AAAGCTCTTG
 2941 AGTTTATTCC TTCAGACCAG CAGGTAATTA ATGAGATGGT TCGGGAATA GATGGCCATG
 3001 TCTTGAAGTG TGTGAAAGAT CAGAATGGCA ATCACGTGGT TCAGAAATGC ATTGAATGTG
 3061 TACAGCCCCA GTCTTTGCAA TTATCATCG ATGCGTTTAA GGGACAGGTA TTTGCCTTAT
 3121 CCACACATCC TTATGGCTGC CGAGTGATTC AGAGAATCCT GGAGCACTGT CTCCTGACC
 3181 AGACACTCCC TATTTTAGAG GAGCTTACC AGCACACAGA GCAGCTTGTA CAGGATCAAT
 3241 ATGGAAATTA TGTAATCAA CATGTACTGG AGCACGGTGC TCCTGAGGAT AAAAGCAAAA
 3301 TTGTAGCAGA AATCCGAGGC AATGTACTTG TATTGAGTCA GCACAAATTT GCAAGCAATG
 3361 TTGTGGAGAA GTGTGTTACT CACGCCTCAC GTACGGAGCG CGCTGTGCTC ATCGATGAGG

5'  TGAGG

 TGTGCACCATGAAC


3421 TGTGCACCAT GAACGACGGT CCCCACAGTG CTTATACAC CATGATGAAG GACCAGTATG
 3481 CCAACTACGTGGTCCAGAAG ATGATTGACG TGGCGGAGCC AGGCCAGCGGAAGATCGTCA
 3541 TGCATAAGAT CCGGCCCCAC ATCGCAACTC TTCGTAAGTA CA CCTATGGC AAGCACATTC

3'  GGATACCGTTCGTGTAAG

 AC 5'

3601 TGCCAAAGCT GGAGAAGTAC TACATGAAGA ACGGTGTTGA CTTAGGGCCCATCTGTGGCC
 3661 CCCCTAATGG TATCATCTGA

Lampiran 10. Sertifikat Analisis RNeasy Mini Kit



QIAGEN Certificate of Analysis

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

Quality Control Passed

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

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

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

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

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


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

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

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

Certified by: *A. Diers* Date: 05/17/10
0905/1 (mm/dd/yy)

Lampiran 11. 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. Dides Date: 05/07/10
0409/1 (mm/dd/yy)

Lampiran 12. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian
(Sambrook, J., et al., 1989, Ausubel, 2001)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Natrium hidroksida 1 N	Sebanyak 4 g natrium hidroksida dilarutkan dalam akuades hingga tepat 100 mL.
2.	Asam klorida 1 N	Sebanyak 8,33 mL larutan asam klorida pekat 12 N ditambahkan akuades hingga tepat 100 mL.
3.	Larutan akrilamid 30 %	Sebanyak 29 g akrilamid dan 1 g dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL. Kemudian larutan disaring dengan menggunakan filter Whatman dengan ukuran pori 0,45 mikron dan disimpan dalam botol kaca yang sudah dilapisi dengan aluminium foil dengan suhu penyimpanan 2-4°C.
4.	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.
5.	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.
6.	Larutan APS (Ammonium Persulfate) 10%	Sebanyak 10 g ammonium per sulfate dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.
7.	Larutan stok <i>Crystal Violet</i> 1,6 µg/µl	Sebanyak 32 mg <i>Crystal Violet</i> dilarutkan dalam 20 mL akua demineralisata hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruang.
8.	Larutan gliserol 30 %	Sebanyak 30 mL larutan gliserol 100% ditambahkan akuabides hingga tepat 100 mL.

(lanjutan)

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
9.	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 121oC, tekanan 2 atm selama 15 menit.
10.	Larutan loading buffer 6 X	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 121oC, tekanan 2 atm selama 15 menit. Larutan disimpan pada suhu 2-8°C.
11.	Larutan PBS (<i>Phospate Buffered Saline</i>) 1 X	Sebanyak 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ dan 0,24 g KH ₂ PO ₄ dilarutkan dalam 800 mL akuabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 7,4 dan ditambahkan dengan akuabides hingga 1000 mL.
12.	Larutan Trypan Blue 10 X	Sebanyak 200 mg Trypan Blue dilarutkan dalam PBS hingga tepat 50 mL.
13.	Larutan dNTP <i>mix</i> 10 mM	Sebanyak 5 µl dATP 100 mM, 5 µl dTTP 100 mM, 5 µl dCTP 100 mM dan 5 µl dGTP 100 mM ditambahkan air bebas nuklease hingga volume akhirnya 50 µl. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2-4°C.
14.	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.

(lanjutan)

No.	Nama Dapar dan Reagen	Cara Pembuatan
15.	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.
16.	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.
17.	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.
18.	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.
19	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.