



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP PROLIFERASI SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA DENGAN UJI MTT DAN MTS**

SKRIPSI

**MICHELLE GOZAL
0806327906**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP PROLIFERASI SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA DENGAN UJI MTT DAN MTS**

SKRIPSI

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

**MICHELLE GOZAL
07806327906**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2012**

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 19 Juni 2012



Michelle Gozal

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Michelle Gozal
NPM : 0806327906
Tanda tangan : 
Tanggal : 12 Juni 2012

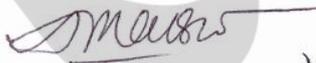
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Michelle Gozal
NPM : 0806327906
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji MTT dan MTS

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

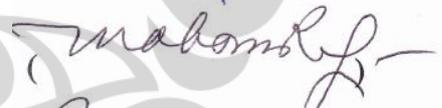
Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si

()

Pembimbing II : Aroem Naroeni, DEA, Ph.D

()

Penguji I : Prof. Dr. Maksum Radji, M.Biomed

()

Penguji II : Dr. Drs. Herman Suryadi, M.S., Apt.

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 17 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas segala berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi 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 mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing I, yang telah memberikan waktu, tenaga dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Aroem Naroeni, DEA., Ph.D, selaku pembimbing II, yang telah memberikan memberikan waktu, pikiran, perhatian, nasihat dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta memberikan bimbingan ilmu, motivasi, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Tim Peneliti Unggulan Genom UI 2009-2012 (dr. Budiman Bela, Dr.rer.physiol. dr. Septelia I. Wanadi, drg. Endang W. Bachtiar, PhD, Dr. Amarila Malik, Apt., MSi., Drs. Bambang Wispriyono, Apt., PhD. Dan Aroem Naroeni, DEA., Ph.D) yang telah mempercayai pengerjaan sebagian riset Hibah-UI nya kepada saya.
4. Ibu Prof. Dr. Effionora Anwar M.S, selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan pikiran yang sangat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.

5. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan sehingga saya dapat menimba ilmu di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.
6. Pembina, Ketua Pengurus serta anggota, staf karyawan Laboratorium *Institut of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), khususnya dr. Fera Ibrahim, M.Sc, Ph.D, SpMK selaku *Director for Science* dan dr. Budiman Bela selaku *Vice Director for Science* IHVCB-UI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di laboratorium IHVCB-UI.
7. Kedua orang tua (Ayahanda Syofian dan Ibunda Oey Sioe Hoen), adik (Jessica Gozal) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini.
8. Sahabat-sahabat saya, Merrie, Fungi, Stepfina, Evennia, Jenifer, dan Patricia yang telah berjuang bersama saya selama perkuliahan, Rudy, Tris, Nurul, dan Winnie yang telah menjadi tempat saya berbagi suka dan duka selama penelitian, Dokter Aida, yang telah banyak sekali membantu saya dalam menyelesaikan penelitian sekaligus skripsi ini, dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan bantuan hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

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

Penulis
2012

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

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

Nama : Michelle Gozal
NPM : 0806327906
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji MTT dan MTS

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 memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan pemilik Hak Cipta.

Adapun hak cipta karya ilmiah ini dimiliki oleh *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia (IHVCB-UI)*

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Pada tanggal: 12 Juni 2012

Yang menyatakan



Michelle Gozal

ABSTRAK

Nama : Michelle Gozal
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji MTT dan MTS

Karakteristik sel punca kanker payudara sangat penting diketahui untuk memaksimalkan terapi kanker payudara. Interaksi antara sel punca dengan lingkungan mikronya merupakan salah satu karakter sel punca yang diteliti pada penelitian ini. Lingkungan mikro, misalnya sel fibroblas, dapat mempengaruhi proliferasi sel punca kanker payudara melalui suatu jalur persinyalan tertentu. Penelitian ini bertujuan untuk mengamati perbedaan proliferasi sel punca kanker payudara dengan beberapa perlakuan berbeda, yaitu berupa pengko-kulturan dengan sel fibroblas normal dan kanker, dengan menggunakan uji MTT dan MTS. Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas dipanen pada hari kedua dan keempat untuk diamati secara mikroskopik dan diuji proliferasinya. Pengamatan secara mikroskopik, menunjukkan bahwa sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker mengalami peningkatan jumlah *mammospheres* yang mengindikasikan sifat kepuncaan sel kanker. Pengujian MTT dan MTS memperoleh hasil yang serupa, yaitu lingkungan mikro, dalam hal ini berupa sel fibroblas, dapat mempengaruhi tingkat proliferasi sel punca kanker payudara. Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker menunjukkan tingkat proliferasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal.

Kata Kunci : kanker, MTS, MTT, proliferasi, sel fibroblas, sel punca
xiv+60 halaman: 11 gambar; 4 tabel; 6 lampiran
Daftar Pustaka : 56 (1874–2011)

ABSTRACT

Name : Michelle Gozal
Program Study : Pharmacy
Title : The Effect of Normal and Cancer Fibroblast Cells Microenvironment toward the Proliferation of Breast Cancer Stem Cells Using MTT and MTS assay.

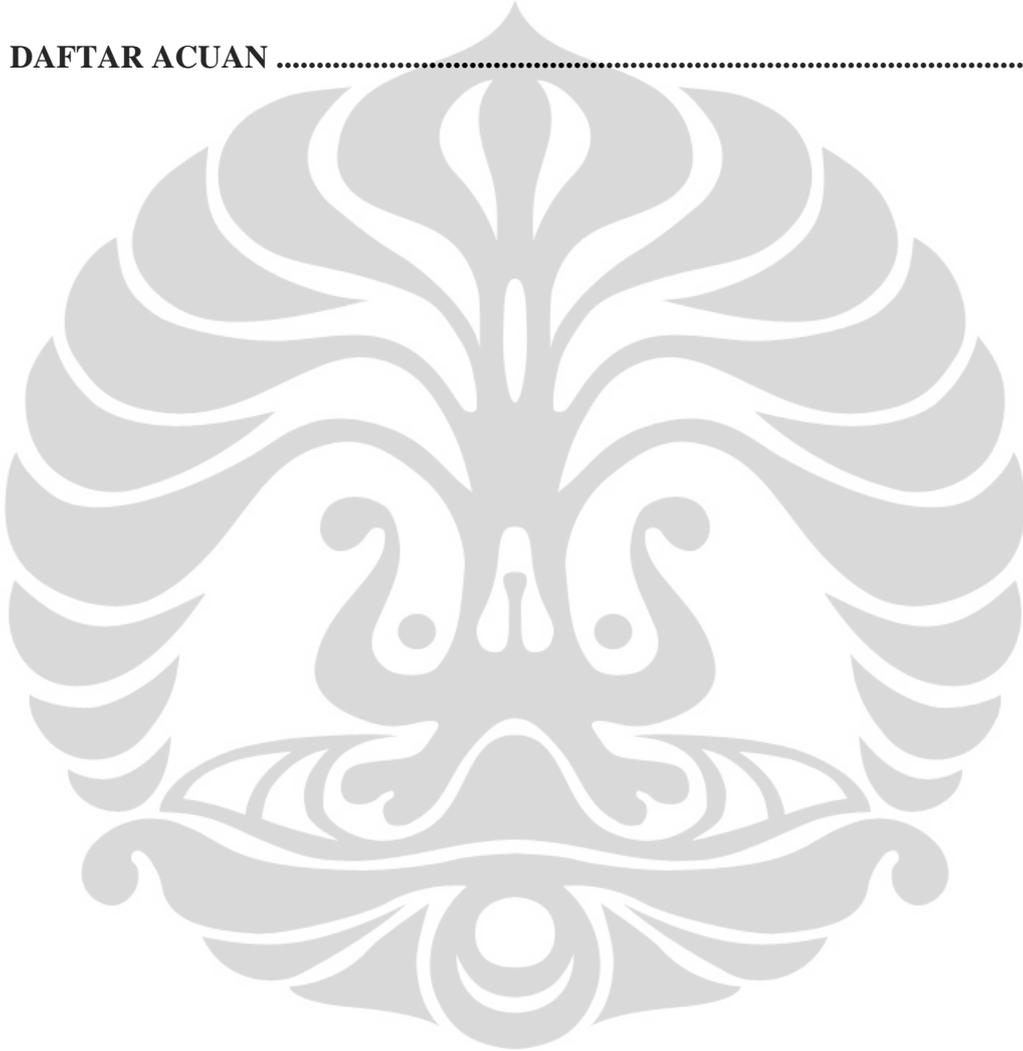
Understanding the characteristics of breast cancer stem cell is essential to optimize breast cancer therapy. The interaction between stem cell and microenvironment is one of these characteristics which is examined in this study. Fibroblast cell as an example of stem cell microenvironment can influence breast cancer stem cell proliferation through some particular signaling pathways. The objective of the study is to observe the difference of breast cancer stem cell proliferation under some conditions, which are co-cultured with normal fibroblast cell and cancer fibroblast cell, to understand the interaction of stem cell and its microenvironment. Breast cancer stem cell co-cultured with fibroblast cell was harvested on second day and fourth day to be examined microscopically and to be tested by using proliferation assay, such as MTT and MTS assay. Microscopic examination showed that breast cancer stem cell co-cultured with cancer fibroblast cell exhibited an increase amount of mammosphere, which indicate a stem cell like properties. MTT and MTS assay showed similar results, that microenvironment can influence breast cancer stem cell proliferation. Breast cancer stem cell co-cultured with cancer fibroblast cell showed a higher proliferation level compared to the one co-cultured with normal fibroblast cell.

Key Words : cancer, fibroblast cell, MTS, MTT, proliferation, stem cells
xiv+60 pages : 11 pictures; 4 tables; 6 appendices
Bibliography : 56 (1874–2011)

DAFTAR ISI

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
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Anatomi Payudara Manusia	4
2.2 Kanker Payudara	6
2.3 Sel Punca Kanker Payudara.....	7
2.4 Lingkungan Mikro dan Matriks Ekstraseluler	10
2.5 Mekanisme Proliferasi Sel Punca Normal dan Kanker.	13
2.6 Pengujian Proliferasi dengan MTT	15
2.7 Pengujian Proliferasi dengan MTS.....	17
3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	19
3.2 Alat	19
3.3 Bahan.....	19
3.4 Cara Kerja.....	20
3.4.1 Persiapan Media Kultur DMEM Tinggi Glukosa	21
3.4.2 Pengkulturan Sel Fibroblas dan Sel Punca Kanker Payudara	22
3.4.2.1 Pengkulturan Sel Fibroblas Normal dan Kanker	22
3.4.2.2 Pengkulturan Sel Punca Kanker Payudara.....	23
3.4.3 Pengko-kulturan Sel Punca dengan Sel Fibroblas Kanker Payudara.....	23
3.4.4 Pengujian Proliferasi dengan MTT	24
3.4.5 Pengujian Proliferasi dengan MTS.....	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Pembuatan Medium Kultur	27
4.2 Penyiapan Kultur Sel.....	28
4.3 Pengko-kulturan Sel Punca dengan Sel Fibroblas Kanker Payudara	30

4.4	Pengujian Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara	33
4.4.1	Uji MTT.....	33
4.4.2	Uji MTS.....	39
4.5	Pengaruh Lingkungan Mikro terhadap Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara.....	44
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	47
5.1	Kesimpulan	47
5.2	Saran	47
	DAFTAR ACUAN	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Anatomi payudara normal manusia	4
Gambar 2.2.	Perkembangan kelenjar payudara	5
Gambar 2.3.	Asal usul sel punca kanker	9
Gambar 2.4.	Siklus sel	14
Gambar 2.5.	Struktur molekul MTT dan reaksi produknya	16
Gambar 2.6.	Struktur molekul MTS dan reaksi produknya	17
Gambar 3.1.	Skema kerja dan alur penelitian	21
Gambar 3.2.	Skema kerja pengujian MTT	24
Gambar 3.3.	Skema kerja pengujian MTS	25
Gambar 4.1.	Pertumbuhan sel fibroblas kanker dan normal pada <i>flask</i> T-25 dengan perbesaran 400 kali	28
Gambar 4.2.	<i>Mammospheres</i> dalam mikroplat <i>low attachment</i> dengan perbesaran 400 kali	29
Gambar 4.3.	<i>Feeder layer</i> sel fibroblas untuk ko-kultur dengan perbesaran 100 kali	30
Gambar 4.4.	Pertumbuhan ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas kanker dengan perbesaran 100 kali	32
Gambar 4.5.	Kristal formazan dengan perbesaran 400 kali	34
Gambar 4.6.	Kurva standar uji MTT	35
Gambar 4.7.	Perkembangan sel punca kanker payudara yang diukur dengan uji MTT	38
Gambar 4.8.	Kurva standar uji MTS	40
Gambar 4.9.	Perkembangan sel punca kanker payudara yang dikur dengan uji MTS	43
Gambar 4.10.	Perbandingan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara dengan uji MTT	45
Gambar 4.11.	Perbandingan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara dengan uji MTS	45

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil pengukuran serapan uji MTT	36
Tabel 4.2.	Jumlah sel punca kanker payudara diukur dengan uji MTT	37
Tabel 4.3.	Hasil pengukuran serapan uji MTS.....	41
Tabel 4.4.	Jumlah sel punca kanker payudara diukur dengan uji MTS	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>)	52
Lampiran 2.	Komposisi TACS [®] MTT Cell Proliferation Assay.....	53
Lampiran 3.	Komposisi CellTiter 96 [®] AQueous One Solution.....	55
Lampiran 4.	Perhitungan kurva standar	57
Lampiran 5.	Gambar alat yang digunakan dalam penelitian	58
Lampiran 6.	Surat persetujuan komisi etik	59



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sel punca merupakan sel tunggal yang dapat bereplikasi untuk memperbanyak diri atau berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Keberadaan sel punca (*stem cell*) bukan hal yang baru lagi bagi dunia kedokteran dan pengobatan. Satu abad setelah perkembangan teori sel oleh Johannes Muller dan Rudolf Virchow pada awal 1800an, Till dan McCulloch (1961) menemukan sifat *self-renewal* dan diferensiasi dari sel hematopoietik yang berkembang menjadi dewasa, dimana sifat ini merupakan sifat khas dari sel punca. Clarke (2005) juga menyatakan bahwa populasi sel punca yang ada dalam jumlah terbatas pada organ-organ tubuh memacu pertumbuhan sel dewasa yang menghidupkan kembali dirinya dalam suatu proses yang disebut *self-renewal*. Kemampuan *self-renewal* sel punca didapatkan dengan mengintroduksi faktor-faktor OCT3/4, SOX, Klf4, dan c-Myc, dimana disebut juga sebagai *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Pada perkembangan kanker, ada populasi sel yang mengalami transformasi dengan banyak sifat sel punca yang diduga bertanggungjawab atas asal-usul sel kanker dan mempertahankannya. Sel yang disebut sebagai sel punca kanker ini berbeda dari populasi sel tumor lainnya yang umumnya telah berdiferensiasi. Sel ini berperan penting dalam progresi dan resistensi kanker terhadap terapi.

Kanker diketahui sebagai produk akumulasi dari mutasi genetik berulang pada sel. Kanker payudara merupakan tipe kanker yang paling umum terjadi pada wanita. Kemungkinan bagi wanita didiagnosis memiliki kanker payudara dari umur 30 sampai 40 tahun hanya 1 dari 520 orang. Dari umur 40 sampai 50 tahun, kemungkinannya 1 dari 68 orang, dan dari umur 50 sampai 60 tahun, menjadi 1 dari 35 orang (Turkington dan Krag, 2005). Di Indonesia sendiri, kanker payudara memiliki frekuensi kejadian yang tinggi dan merupakan penyebab kematian kedua pada kasus kanker pada wanita (Depkes RI, 2007, h.52). Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2006, angka kejadian kanker payudara menempati urutan pertama pada pasien rawat inap di seluruh Indonesia dengan

jumlah sebesar 19,64%, kemudian disusul oleh kanker leher rahim sebesar 11,07% (Aditama, 2010).

Sel punca pada kanker payudara dapat diidentifikasi keberadaannya dengan menggunakan ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi namun ekspresi penanda permukaan CD24 yang rendah (CD44⁺/CD24⁻). Dengan penanda permukaan tersebut, sel kanker yang tumorigenik dan non-tumorigenik dapat dibedakan (Al-Hajj et al., 2003). Identifikasi dan isolasi sel punca kanker payudara akan sangat menentukan keberhasilan terapi kanker payudara dimasa mendatang yang lebih memfokuskan pada upaya menghilangkan sel punca kanker daripada hanya mengecilkan masa tumor.

Pengobatan konvensional terhadap kanker memfokuskan pada penghancuran sel kanker, bukan sel punca kanker dengan potensi proliferasi besar dan tidak terbatas. Sel punca kanker memiliki resistensi terhadap obat, kemoterapi, ataupun radioterapi. Hal ini memungkinkan timbulnya kekambuhan tumor setelah beberapa tahun. Apabila target terapi diubah mengarah pada penghancuran sel punca kanker maka sel tumor akan kehilangan kemampuan untuk meregenerasi dirinya dan pada akhirnya sel tumor tidak akan berkembang. Terapi ditargetkan pada sinyal ekstrinsik lingkungan mikro yang yang meregulasi *self-renewal* dan/atau diferensiasi. Keberadaan terapi ini diharapkan dapat membawa keberhasilan dalam mengobati kanker.

Pengembangan terapi yang ditargetkan pada sel punca kanker sangat membutuhkan pengetahuan menyangkut karakteristik sel punca. Salah satu karakteristik sel punca kanker yang sangat penting bagi kelangsungan hidup sel punca adalah lingkungan mikro. Sel-sel punca dalam tubuh organisme berada dalam suatu lingkungan mikro yang melindunginya dan dikenal sebagai relung (*niche*). Bissell dan LaBarge (2005) menyatakan bahwa tidak ada sel yang dapat menjalankan kehidupannya tanpa ada instruksi dari lingkungan mikronya dan bahkan sel tidak akan ada tanpa adanya instruksi tersebut. Sinyal instruksi dari lingkungan mikro sangat dibutuhkan untuk perkembangan dan diferensiasi dari sel punca maupun sel progenitornya.

Lingkungan mikro sendiri, selain mengandung sel punca, juga mengandung sel endotel vaskuler, sel perisit, sel stromal, serta sel-sel imun dan

suplai saraf. Sel stroma merupakan sekelompok sel yang bekerja sebagai “matras” pendukung dimana sel punca dan sel progenitor berada. Sel stroma dapat berupa sel endotel, sel lemak, fibroblas, makrofag, dan retikulum. Sel stroma memiliki banyak peranan penting karena kemampuannya memproduksi berbagai enzim, seperti *matrix metalloproteinase*, molekul adhesi, produk protein ekstraseluler, dan khemokin (Sujata dan Chaudhuri, 2008). Antara sel punca dan sel stroma terjadi suatu interaksi, yaitu dalam bentuk *crosstalk*, yang berperan penting pada proses proliferasi dan diferensiasi sel punca. Pada penelitian ini, akan dibahas mengenai pengaruh lingkungan mikro, khususnya sel fibroblas, terhadap proliferasi sel punca kanker payudara yang ditentukan melalui uji MTT dan MTS.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh sel fibroblas dalam lingkungan mikro, baik normal maupun kanker, terhadap proliferasi sel punca kanker payudara yang diamati dengan menggunakan uji MTT dan MTS.

1.3 Manfaat Penelitian

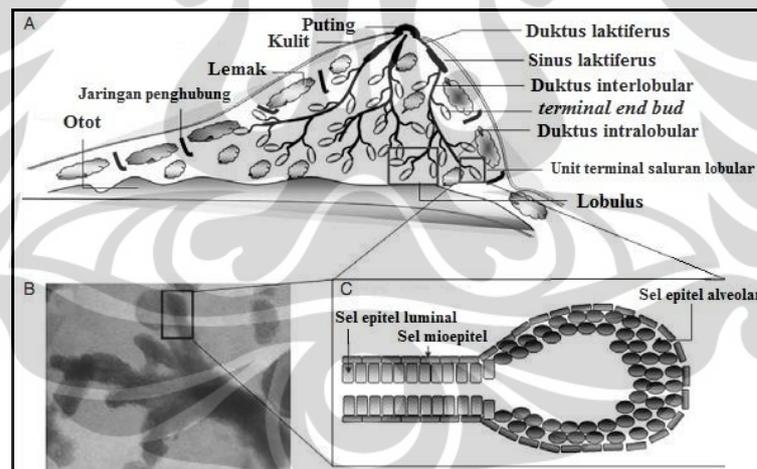
Manfaat dari penelitian ini adalah mempelajari karakteristik sel punca kanker payudara pada pasien penderita kanker payudara di Indonesia. Dengan demikian, pengetahuan ini akan berkontribusi pada pengembangan terapi kanker yang lebih efektif dibandingkan terapi konvensional.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi Payudara Manusia

Kelenjar payudara (*mammary glands*) merupakan suatu organ tubualveolar yang terdiri dari duktus dan lobulus (Gambar 2.1). Proses di dalam kelenjar payudara diawali dengan sekresi susu pada *terminal end buds* atau alveoli sekresi. Beberapa alveoli ini kemudian dikelompokkan dalam suatu lobulus, yang mengalirkan susu ke duktus intralobular. *Terminal end buds* dan duktus intralobular membentuk suatu struktur yang disebut unit terminal saluran lobular (TLDU). Susu dari duktus intralobular kemudian dialirkan ke duktus interlobular. Tiap kelenjar payudara memiliki 15–25 lobus dimana tiap lobus mengandung lobulus. Masing-masing lobus tersebut selanjutnya mengalirkan susu ke sinus laktiferus dan dari situ ke duktus laktiferus untuk kemudian dikeluarkan lewat puting.



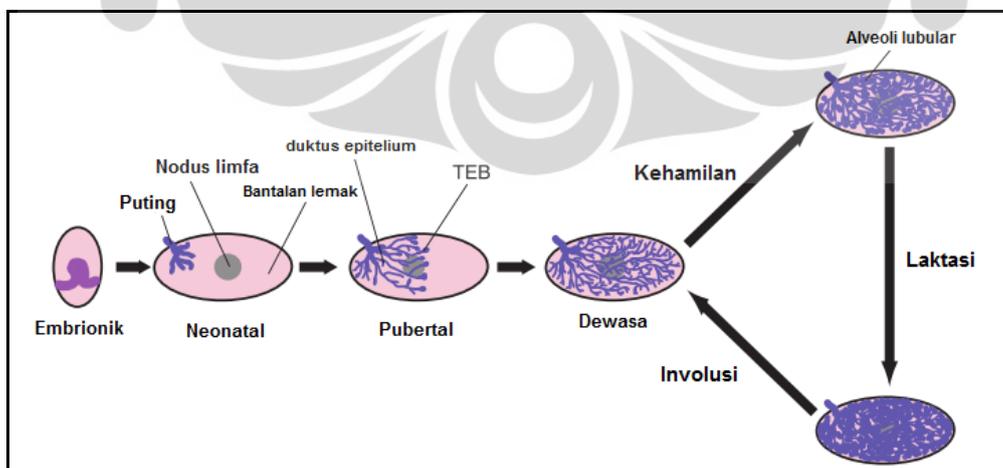
[Sumber: Bapat, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.1. Anatomi payudara normal manusia

Jaringan epitel payudara terdiri dari 3 tipe sel, seperti yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 Panel C, yaitu sel mioepitelium yang membentuk lapisan basal alveoli dan duktal, sel epitelium duktal yang membatasi lumen duktal, dan sel epitelium alveolar yang menghasilkan susu. Sel epitelium duktal dan alveolar akan membentuk lapisan luminal (Bapat, 2009). Struktur epitelium ini terletak pada

matriks stroma yang terdiri dari sel stromal, seperti fibroblas dan adiposa, sekaligus komponen ekstraselular (Neville, Medina, Monks, dan Hovey, 1998).

Selama perkembangan reproduksi wanita, struktur jaringan payudara selalu berubah (Gambar 2.2). Epitelium payudara spesifik dari puting akan masuk ke bantalan jaringan lemak (*fatty tissue*), yang disebut bantalan lemak payudara (*mammary fat pad*), dan kemudian membentuk duktal kecil dan bercabang pada bagian proksimal dari bantalan lemak. Setelah dilahirkan, epitelium berkembang dan akan mengalami perubahan selama pubertas karena adanya hormon ovarian. Perubahan ini berupa membengkaknya ujung distal duktus payudara menjadi struktur bulbus yang terbentuk dari sel epitelium kubus sehingga terbentuklah *terminal end buds*. *Terminal end buds* adalah bagian depan duktus yang berproliferasi, menyebar ke bantalan lemak, dan membentuk cabang sampai duktus mencapai batas bantalan lemak, kemudian *terminal end buds* mengalami kemunduran. Perkembangan akhir dari kelenjar payudara dicapai ketika masa kehamilan dan laktasi. Hormon reproduksi menginduksi ekspansi dan diferensiasi terminal dari epitelium payudara menjadi sel sekretori, memproduksi susu, lobular alveoli, dan lemak yang besar. Ketika masa menyusui berakhir, epitelium sekretori dari kelenjar payudara mati melalui proses apoptosis, sel lemak mengalami rediferensiasi, dan kelenjar kembali seperti payudara sebelum memasuki masa kehamilan. Proses inilah yang disebut involusi (Wiseman dan Werb, 2002).



[Sumber: Wiseman dan Werb, 2002, telah diolah kembali]

Gambar 2.2. Perkembangan kelenjar payudara

2.2 Kanker Payudara

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, hormon, kondisi imun, dan metabolisme. Kanker memiliki beberapa stadium yang dibagi berdasarkan tingkat penyebaran penyakit saat didiagnosis. Penentuan stadium sangat penting untuk memutuskan terapi yang tepat dalam penanganan kanker (*American Cancer Society*, 2011).

Pada awalnya, kanker payudara tidak menimbulkan gejala. Paling umum, gejala yang pertama adalah benjolan, yang biasanya terasa jelas berbeda dari jaringan payudara di sekitarnya. Pada tahap awal, benjolan dapat bergerak bebas di bawah kulit ketika didorong dengan jari. Pada tahap lebih lanjut, benjolan biasanya melekat pada dinding dada atau kulit di atasnya. Dalam kasus ini, benjolan tidak dapat bergerak sama sekali atau tidak dapat dipindahkan secara terpisah dari kulit di atasnya. Jika mengandung kanker payudara yang melekat pada dinding dada atau kulit, manuver ini dapat membuat kulit mengerut atau satu payudara tampak berbeda dari yang lain. Pada tahap selanjutnya, benjolan bengkak atau luka bernanah mungkin berkembang pada kulit. Kadang-kadang kulit di atas benjolan lesung pipit dan kasar dan tampak seperti kulit jeruk (*peau d'orange*) (*Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy*, 2008).

Perkembangan kelenjar payudara menunjukkan banyak karakteristik yang berhubungan dengan perkembangan tumor. Sel epitelium pada *terminal end buds* berproliferasi secara cepat kemudian masuk ke jaringan stroma, seperti tumor solid (Wiseman dan Werb, 2002). Pada payudara normal, lingkungan mikro epitelium luminal terdiri dari sel mioepitelial, *basement membrane*, dan stromal. Sedangkan pada kanker payudara, tidak ada sel mioepitelial dan *basement membrane* sehingga sel tumor langsung berhubungan dengan stromal.

2.3 Sel Punca Kanker Payudara

Istilah “punca” atau “*stem*” dideskripsikan oleh Ernst Haeckel sebagai konsep evolusi atau organisme. Konsep ini beranggapan bahwa “*stem*” merupakan nenek moyang dari organisme dimana semua organisme lain berevolusi. Lebih dari 150 tahun yang lalu, Cohnheim dan Durante membentuk konsep bahwa kanker dapat timbul dari sebagian kecil sel dengan karakteristik sel punca. Pada tahun 1961, Till dan McCulloch mendemonstrasikan untuk pertama kali bahwa keberadaan dari sel punca hematopoietik dalam sumsum tulang, yang dianggap memiliki sifat seperti sel punca, mungkin merupakan asal mula kanker. Model sel punca kanker pertama kali berkembang pada tahun 1994, dimana sel penginisiasi keganasan dibedakan pada penyakit leukemia myeloid akut (AML) pada manusia. Sejak saat itu, model sel punca kanker serupa diperluas ke beberapa tumor yang berasal dari payudara, otak, paru-paru, prostat, kolon, kepala dan leher, dan pankreas.

Pada kanker payudara, dari keseluruhan sel kanker, hanya sebagian kecil sel yang mampu yang memiliki kemampuan untuk membentuk sel kanker yang baru (Al Hajj et al., 2003). Sel tumor tersebut kemudian dikenal sebagai sel punca kanker atau *cancer stem cell*, yang memiliki kemampuan *self-renewal* yang ekstensif dan dapat merekapitulasi patofisiologi tumor pada hewan coba yang imunodefisiensi (Tang, Beng, dan Shazib, 2007). Selain *self-renewal*, sel punca juga memiliki karakteristik diferensiasi multipoten yang berkontribusi pada heterogenitas seluler.

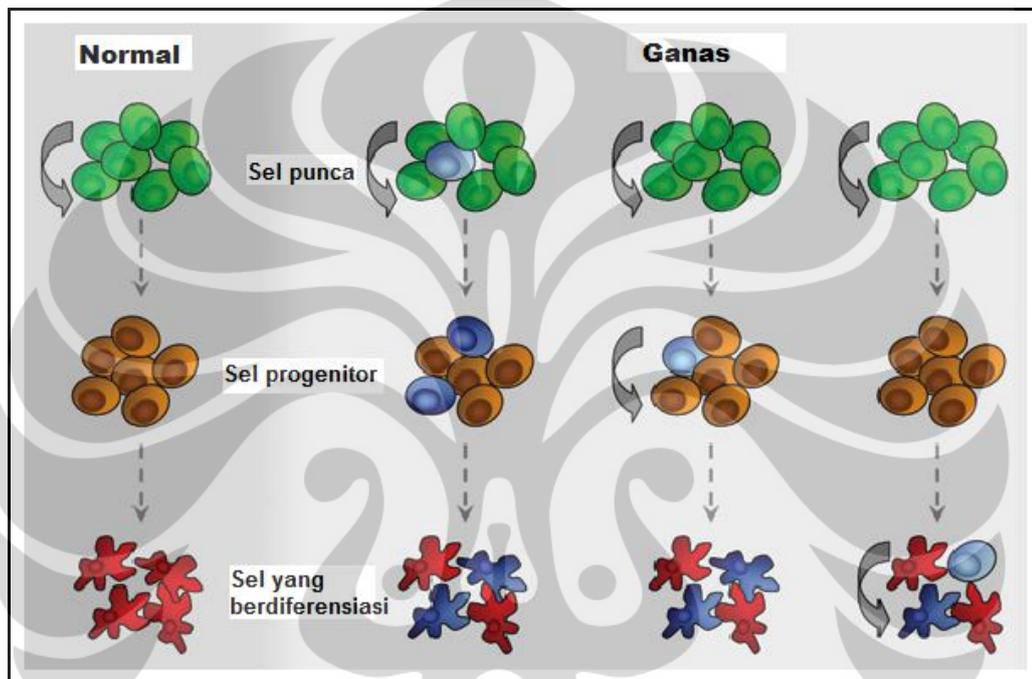
Sel kanker merupakan sel yang menunjukkan heterogenitas seluler sehingga menimbulkan dugaan bahwa sel-sel tersebut mengalami modifikasi selama pertumbuhannya. Heterogenitas sel kanker dapat terjadi karena adanya pembelahan sel, baik asimetrik maupun simetrik. Sel punca normal mengalami pembelahan asimetrik menghasilkan dua sel anak, yaitu sel punca dan sel progenitor, dengan potensi diferensiasi multipoten dimana sel punca akan menetap pada jaringan dan sel progenitor akan bermigrasi ke jaringan lain. Pembelahan simetrik terjadi apabila dibutuhkan rekonstitusi populasi sel punca. Pembelahan pada sel punca kanker tidak jelas berupa pembelahan asimetrik atau simetrik. Selama pembelahan simetrik, sel punca kanker sangat rentan mengalami

perubahan epigenetik sehingga dihasilkan populasi sel yang heterogen dan hanya sebagian yang menunjukkan sifat sama dengan induknya (Hill dan Perris, 2007).

Subpopulasi sel kanker payudara memiliki sifat sel punca dengan fenotip CD44⁺/CD24⁻ (Al-Hajj et al., 2003) yang berarti memiliki ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi namun ekspresi penanda permukaan CD24 yang rendah. Identifikasi penanda permukaan CD44⁺/CD24⁻ dapat membantu proses isolasi sel punca kanker payudara. Isolasi sel punca epitelium payudara manusia juga dilakukan dengan sistem kultur in vitro sebagai upaya untuk memahami peran dan pentingnya sel punca kanker. Dontu dan rekan-rekannya (2003) telah berhasil mendemostrasikan sistem kultur in vitro bagi sel punca epitelial payudara manusia yang memungkinkan propagasi sel punca dan sel progenitor dalam keadaan tidak berdiferensiasi, berdasarkan kemampuannya untuk berproliferasi dalam suspensi sebagai struktur sferis, yang disebut sebagai “*nonadherent mammospheres*”. Strategi kultur ini dilakukan dengan menanam sel dalam plat *low attachment* dengan medium yang mengandung faktor pertumbuhan penstimulus aktivasi sel punca. Sebagian besar sel akan mengalami kematian karena ketidakmampuannya untuk menempel. Sebagian kecil sel yang mampu bertahan membentuk bola mengambang yang disebut *mammospheres*. *Mammospheres* memiliki karakter sel punca atau sel progenitor dengan kemampuan untuk berdiferensiasi serta *self-renewal*. Hal tersebut dibuktikan oleh Ponti dan rekan-rekannya (2005) melalui pengujian dengan *flow-cytometri* yang menunjukkan bahwa sebagian besar *mammospheres* (95 - 98%) pada kultur memperlihatkan ekspresi CD44⁺/CD24⁻.

Asal-usul sel punca kanker masih belum dapat dipastikan. Ada pendapat bahwa sel punca kanker berasal dari transformasi sel punca normal, yang pada dasarnya telah memiliki sifat *self-renewal*, atau progenitor yang mendapatkan kembali kemampuan *self-renewal* akibat mutasi (Reya, Morrison, Clarke, dan Weisman, 2001). Pendapat lain menyatakan bahwa ada kemungkinan sel yang telah berdiferensiasi kembali memiliki sifat *self-renewal* karena adanya reaktivasi jalur persinyalan atau introduksi faktor-faktor transkripsi. Salah satu contoh reaktivasi jalur persinyalan adalah jalur Wnt-β-catenin yang dapat mempertahankan sifat *self-renewal* sel dan pada akhirnya akan terjadi proliferasi

ganas (Reya dan Clevers, 2005). Pada tahun 2006, Takahashi dan Yamanaka membuktikan bahwa dengan mengintroduksi faktor-faktor transkripsi, yaitu SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc, dapat menyebabkan sel yang telah berdiferensiasi memperoleh kembali sifat *self-renewal*. Dalam percobaannya, mereka mengubah sel yang telah berdiferensiasi pada embrio mencit dan fibroblas dewasa menjadi sel punca pluripoten (iPS).



[Sumber: Welte, 2010, telah diolah kembali]

Gambar 2.3. Asal usul sel punca kanker

Pada jaringan normal, sel punca membelah secara asimetrik menjadi sel progenitor kemudian menjadi sel yang berdiferensiasi terminal (Gambar 2.3). Pada tumorigenesis, mutasi dapat terjadi pada sel punca normal (hijau), sel progenitor (orange), ataupun pada sel yang telah berdiferensiasi (merah). Mutasi pada sel punca normal menyebabkan transformasi sel menjadi sel punca kanker (biru muda) yang kemudian menjadi sel progenitor tumorigenik dan sel tumor yang berdiferensiasi (biru tua) (Welte, Adjaye, Lehrach, dan Regenbrecht, 2010). Mutasi juga dapat terjadi pada sel progenitor sehingga mengakibatkan timbulnya kemampuan bereplikasi. Akan tetapi, jika mutasi tersebut tidak menimbulkan munculnya sifat *self-renewal*, maka sel punca kanker belum dapat dikatakan telah

terbentuk (Jordan, Guzman, dan Noble, 2006). Sel yang telah berdiferensiasi juga dapat berubah menjadi sel punca kanker jika memperoleh kembali sifat sel punca akibat mutasi.

Setelah sel punca kanker terbentuk akibat mutasi pada sel punca normal, sel progenitor, maupun sel yang telah berdiferensiasi, tumor primer pun terbentuk. Selama pengobatan dengan kemoterapi, sebagian besar sel kanker dalam tumor primer mungkin dihancurkan, tetapi jika sel punca kanker tidak dieradikasi, tumor dapat tumbuh kembali dan terjadi relaps. Sel punca kanker yang berasal dari tumor primer tersebut dapat bermigrasi ke tempat jauh dan mengakibatkan metastasis (Jordan, Guzman, dan Noble, 2006).

2.4 Lingkungan Mikro dan Matriks Ekstraseluler

Pada tahun 1889, seorang dokter asal Inggris, Stephen Paget, memperkenalkan hipotesis “tanah dan benih” melalui penelitiannya dengan kanker payudara. “Tanah” adalah lokasi perkembangan tumor dan juga sinyal kimia yang diproduksi dalam lingkungan mikro pada lokasi potensial untuk metastasis dan “benih” seolah-olah adalah sel punca atau sel penginisiasi tumor dari tumor primer. Pada kanker payudara, sel punca epitelium payudara menjadi “benih”nya dimana sel punca epitelium ini memiliki potensi untuk menjadi sel punca kanker dengan adanya pengaruh dari lingkungan mikro (Majumder, 2009).

Sel punca kanker, seperti sel punca jaringan normal, memiliki baik mekanisme intrinsik, *multidrug resistance* (Dean, Fojo, dan Bates, 2005), sekaligus mekanisme ekstrinsik yang dimediasi faktor *survival* dari relung (*niche*). Populasi sel-sel punca dalam tubuh organisme berada dalam suatu relung, yang merupakan suatu lokasi anatomi spesifik dimana terdapat lingkungan mikro yang dipercaya dapat meregulasi generasi jaringan, merawat, dan memperbaikinya (Sujata dan Chaudhuri, 2008). Menurut Baguley (2005), selain mengandung sel punca, relung juga mengandung sel endotel vaskuler, sel perisit, sel stromal, serta sel-sel imun dan suplai saraf. Sel endotel vaskuler dan sel perawat (*nurse cell*) dalam relung memproduksi berbagai faktor dan matriks ekstrasel pendukung yang dibutuhkan untuk bertahan hidup. Sel punca memerlukan sinyal parakrin dari sel-sel dalam relung untuk menjaga kemampuan *self-renewal*. Keberadaan relung

sekaligus lingkungan mikro sangat penting bagi kelangsungan hidup sel punca, seperti yang dinyatakan Bissell dan LaBarge (2005) bahwa tidak ada sel yang dapat menjalankan kehidupannya tanpa ada instruksi dari lingkungan mikronya dan bahkan sel tidak akan ada tanpa adanya instruksi tersebut.

Sel stromal merupakan sekelompok sel yang bekerja sebagai “matras” pendukung dimana sel punca dan sel progenitor berada. Sel stromal, yang dapat berupa sel endotel, sel lemak, fibroblas, makrofag, dan retikulum, memiliki banyak peranan penting karena kemampuannya memproduksi berbagai enzim, seperti *matrix metalloproteinase*, molekul adhesi, produk protein ekstraseluler, dan khemokin, yang semuanya diatur oleh ekspresi gen spesifik. Sel stroma mempunyai peranan penting dalam pertumbuhan dan diferensiasi serta membantu fungsi sel punca, namun yang paling penting adalah fungsi imunologik yang menyertainya (Sujata dan Chaudhuri, 2008).

Interaksi antara sel punca dengan sel stromal terjadi dalam bentuk *crosstalk* dimana kemungkinan mekanismenya berhubungan dengan persinyalan yang dimediasi oleh sitokin. Sinyal dari komponen stroma tidak saja mencakup faktor-faktor *survival* seperti *epidermal growth factor* (EGF), *platelet derived growth factor* (PDGF), dan *insulin growth factor* (IGF), tetapi juga faktor-faktor yang bekerja dalam jalur perkembangan seperti *wnt*, *notch*, dan *hedgedog* (Baguley, 2005). Berbeda dengan faktor-faktor pertumbuhan tersebut, faktor pertumbuhan dari keluarga TGF- β memiliki peran menghambat proliferasi sehingga dapat disimpulkan bahwa stroma payudara berkontribusi baik dalam memberikan sinyal instruktif maupun permisif.

Komunikasi antara stroma dan sel epitelium pada kelenjar payudara berlangsung melalui matriks ekstraseluler yang dihasilkan oleh sel stromal. Matriks ekstraseluler memiliki peran dalam menyalurkan sinyal tertentu yang secara langsung berpengaruh pada pertumbuhan, migrasi, dan diferensiasi dari sel (Lochter dan Bissell, 1995). Matriks ekstraseluler merupakan suatu mesin pengontrol sel untuk menyimpan dan mengaktivasi faktor pertumbuhan selama perkembangan. (*The Extracellular Matrix : the overview*, 2011). Perubahan pada matriks ekstraseluler dapat mengakibatkan mekanisme yang ada di dalamnya menjadi kacau dan pada akhirnya dapat berujung pada keganasan. Lingkungan

mikro ekstraseluler, dimana mengelilingi setiap molekul, memiliki tiga efektor penting, yaitu molekul matriks alami tidak larut (kolagen, laminin, elastin, atau fibronektin), makromolekul larut (faktor pertumbuhan, kemokin, hormon dan sitokin), dan protein pada permukaan sel tetangga (*cadherins*) yang memiliki peran yang penting dalam perkembangan dan *remodeling* kelenjar payudara (Haque, Nagaoka, Hexig, dan Akaike, 2010). Pembagian matriks ekstraseluler sering kali tidak konsisten sehingga untuk menjaga konsistensinya pembagian ini dapat dipandang dari dua sisi, yaitu dari sisi molekuler (kolagen, proteoglikan, dan glikoprotein) dan dari sisi fungsional (*membrane basement* dan *elastic fiber*) (*Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*, 2010).

Sel punca kanker, sel stromal, dan matriks ekstraseluler memiliki hubungan erat satu sama lain. Persinyalan dari sel stromal memfasilitasi perkembangan tumor payudara sehingga keberadaannya sangat penting bagi kelangsungan hidup sel kanker. Perlu dicatat juga bahwa lingkungan mikro kelenjar payudara normal memiliki efek penghambatan terhadap perkembangan kanker payudara (DeCosse, Gossens, Kuzma, dan Unsworth, 1973). Hal ini mengindikasikan bahwa sel kanker dapat menjaga sifatnya hanya dalam lingkungan mikro yang abnormal.

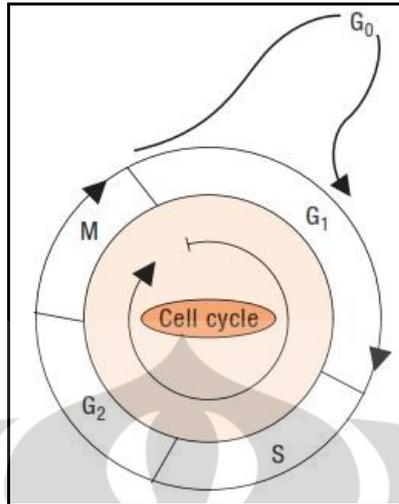
Sel fibroblas sebagai salah satu komponen lingkungan mikro pada kelenjar payudara manusia bisa jadi memberikan pengaruh bagi perkembangan sel punca kanker payudara. Sel fibroblas bertanggung jawab atas sintesis, deposisi, dan *remodeling* dari matriks ekstrasel pada stroma tumor dan juga diketahui sebagai sumber faktor pertumbuhan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan sel kanker (Bhowmick, Nollson, dan Moses, 2004). Sel fibroblas kanker tidak memiliki inhibisi pertumbuhan yang *density dependent*, ketergantungannya terhadap faktor pertumbuhan rendah, masa hidup dengan kemampuan berproliferasi yang tidak terbatas, dan tidak ada hambatan migrasi. Keberadaan sel fibroblas kanker dapat meningkatkan jumlah sel punca kanker payudara (diidentifikasi dengan adanya penanda $CD44^+/CD24^-$) pada *mammospheres* (Huang, Li, dan Nan, 2010). Berbeda dari sel fibroblas kanker, sel fibroblas normal yang tidak memiliki sifat-sifat tersebut akan menginhibisi efek dari pertumbuhan tumor (Shekhar, Werdell, Santner, Pauley, dan Tait, 2001).

Sel punca kanker bersifat resisten terhadap berbagai macam terapi kanker, termasuk kemoterapi dan radioterapi. Banyak terapi kanker yang mengalami kegagalan karena terapi hanya menargetkan pada sel tumor dan tidak mengeliminasi sel punca kanker, yang tetap bertahan dengan mengembangkan tumor baru. Kondisi ini membuka peluang pengembangan obat dengan sel punca kanker sebagai target terapinya. Terapi ditargetkan pada sinyal ekstrinsik lingkungan mikro yang meregulasi *self-renewal* dan/atau diferensiasi. Keberadaan terapi ini diharapkan dapat membawa keberhasilan dalam mengobati kanker.

2.5 Mekanisme Proliferasi Sel Punca Normal dan Kanker

Sel punca normal memiliki sifat memperbaharui diri yang dipertahankan dengan pembelahan simetrik dan asimetrik. Pembelahan asimetrik sel punca menghasilkan sel punca anak dan sel progenitor. Pembelahan simetrik diperlukan untuk merekonstitusi populasi sel punca (Hill dan Perris, 2007). Sel punca normal bersifat multipoten, yaitu sifat yang bermanifestasi dalam kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai fenotip sel.

Proses pembelahan pada sel punca berjalan seiring perkembangan dan pertumbuhan sel. Perkembangan dan pertumbuhan sel membutuhkan suatu koordinasi yang baik dalam suatu organisme. Pertumbuhan ganas dapat terjadi jika koordinasi ini tidak berjalan dengan seimbang. Proliferasi sel normal berlangsung melalui suatu siklus yang terdiri dari 4 fase yang ditentukan dari waktu sintesis DNA, yaitu fase G_1 , fase S, fase G_2 , dan fase M (Gambar 2.4). Sel mamalia tidak membelah secara terus menerus, melainkan ada suatu fase “istirahat” dimana sel berada dalam kondisi tidak aktif (tidak sedang tumbuh), yaitu fase G_0 . Pada fase G_0 dan G_1 , sel memiliki kandungan DNA $2N$ (diploid). Dalam fase S, yang berlangsung selama 12-24 jam, terjadi replikasi DNA sehingga kandungan sel menjadi $4N$. Fase berikutnya adalah fase G_2 , berlangsung selama 2-3 jam, yang merupakan fase pertumbuhan sebelum kemudian siklus sel berlanjut ke fase M dimana terjadi pemisahan kromosom (kariogenesis) dan sel membelah menjadi 2 sel diploid (Cooper, 1995; Gilewski dan Norton, 1995).



[Sumber: *Apoptosis and Cell Proliferation*, 1998, telah diolah kembali]

Gambar 2.4. Siklus sel

Pada umumnya siklus ini berlangsung selama 2-4 hari, namun sesungguhnya yang paling menentukan waktu satu siklus adalah fase G₁. Pada fase ini sel normal melanjutkan siklus sel melalui G₁ atau memasuki fase G₀ untuk beristirahat tergantung oleh ada tidaknya sinyal eksternal tertentu. Faktor pertumbuhan merupakan salah satu contoh sinyal eksternal tersebut. Sinyal ini diperlukan agar sel keluar dari fase istirahat (G₀), masuk ke fase G₁ lalu berlanjut ke fase S. Transduksi sinyal umumnya terjadi berupa komunikasi antar-protein dimana dapat berupa reaksi-reaksi enzimatik ataupun kontak protein dengan protein yang bersifat sementara. Tiap fase ini diatur secara ketat dan waktu yang diperlukan selalu tetap.

Sel punca yang ada dalam lingkungan sel punca normal berada dalam kondisi tidak berproliferasi. Ketika satu sel punca mengalami transisi ke siklus sel dan mengalami pembelahan sel, satu sel anak tetap menjadi sel punca dalam lingkungannya dan yang lainnya pergi untuk menginisiasi proliferasi populasi sel progenitor. Sel ini bermigrasi ke jaringan target, keluar dari siklus sel dan berdiferensiasi. Sebaliknya, sel punca yang ada dalam lingkungan sel punca kanker seluruhnya berada dalam fase siklus sel, bukan fase G₀. Satu sel anak dari sel yang membelah tetap menjadi sel punca dan yang lainnya meninggalkan lingkungannya untuk berproliferasi dan bermigrasi ke jaringan lokal. Sel yang

telah berproliferasi tidak dapat kembali ke fase tidak berproliferasi, dan pada akhirnya tidak dapat berdiferensiasi sempurna kemudian mati (Baguley, 2005).

Siklus sel yang terkontrol erat kaitannya dengan peranan regulator pertumbuhan, yang terdiri dari onkogen (misalnya onkogen Ras dan cyclin/Cdk) dan gen penekan tumor (misalnya p53, BRCA1/BRCA2, Rb, dan lain-lain). Onkogen merupakan bentuk proto-onkogen yang teraktivasi yang dapat memicu pembelahan sel. Aktivasi proto-onkogen tersebut sering terjadi pada sel yang berproliferasi aktif, namun perubahan ke arah ganas dapat dicegah dengan bantuan ekspresi dari berbagai gen penekan tumor (Croce, 2005). Beberapa jenis onkogen secara langsung membatalkan aktivitas protektif gen penekan tumor dan beberapa jenis gen penekan tumor dapat mendeteksi adanya onkogen dan melawannya (Serrano dan Massague, 2000).

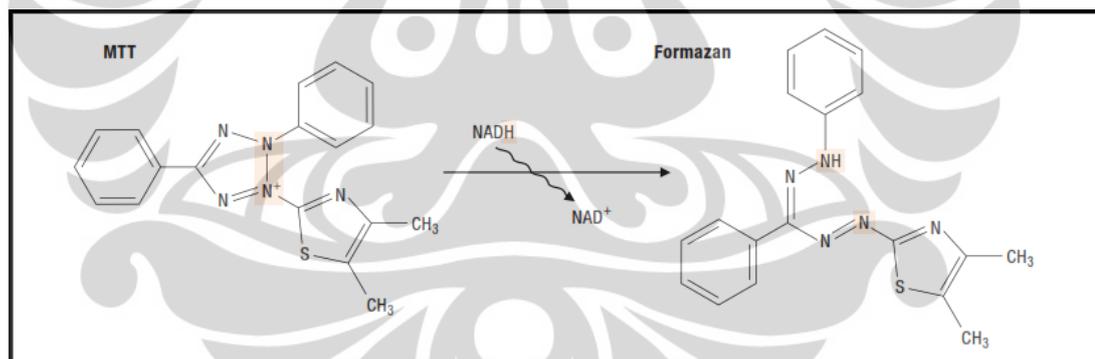
Kanker terjadi melalui proses bertahap dalam jangka waktu yang panjang sehingga memungkinkan terjadi akumulasi kelainan gen yang saling melengkapi dan akhirnya berujung pada keganasan. Perubahan yang terjadi pada sel kanker dapat berupa mutasi gen penekan tumor yang mengakibatkan hilangnya rem pengatur laju pertumbuhan. Mutasi onkogenik juga berperan serta dalam pembentukan transformasi ganas karena ia dapat mengubah kemampuan menyandi gen-gen tertentu sehingga protein yang diproduksinya mengalami berbagai perubahan. Salah satu perubahan yang terjadi adalah diekspresikannya gen secara terus menerus. Selain kedua faktor diatas, kanker dapat pula diakibatkan beberapa kelainan lainnya, misalnya kelainan pada DNA *repair* dan beberapa komponen persinyalan lainnya.

2.6 Pengujian Proliferasi dengan MTT

Uji MTT (*MTT assay*) merupakan salah satu pengujian terhadap proliferasi dan viabilitas sel. Proliferasi sel adalah ukuran jumlah sel yang membelah dalam suatu kultur. Proliferasi sel dapat diukur dengan uji klonogenik, yaitu suatu pengujian yang didasarkan pada prinsip bahwa jika sejumlah sel ditanam pada matriks yang sesuai, maka akan terbentuk sejumlah koloni setelah beberapa saat periode pertumbuhan. Viabilitas sel diukur berdasarkan jumlah sel sehat dalam sampel. Aktivitas metabolik dapat digunakan sebagai salah satu cara

pengukuran viabilitas sel. Parameter ini diukur dengan menguji fungsi vital yang merupakan karakteristik dari sel yang sehat (*Apoptosis and Cell Proliferation*, 1998). Pada awal tahun 1980an, dilaporkan adanya suatu cara pengukuran jumlah sel secara tidak langsung dengan menggunakan pewarna tetrazolium, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium bromida (MTT).

Prinsip dasar dari uji ini adalah pengukuran jumlah sel berdasarkan aktivitas mitokondrial dimana sel yang sehat mampu menjaga dan menyediakan energi untuk menjalankan fungsi sel dan pertumbuhan. Jumlah sel hidup ditentukan dengan reduksi pewarna MTT, yaitu berupa pewarna tetrazolium larut air berwarna kuning. Pereaksi MTT kemudian direduksi oleh sel hidup yang aktif bermetabolisme, tepatnya adalah aksi dari enzim dehidrogenase, membentuk formazan ungu yang tidak larut dalam medium kultur (Gambar 2.5). Jumlah formazan-MTT dapat ditentukan secara spektrofotometri ketika disolubilisasi dalam pelarut yang cocok. Jumlah sel dan sinyal yang diproduksi membentuk suatu hubungan linear sehingga memungkinkan pengukuran akurat laju proliferasi sel.



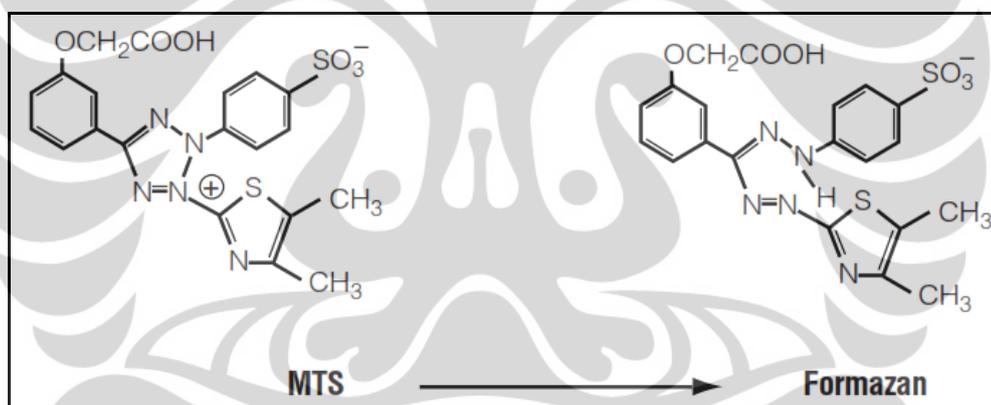
[Sumber: *Apoptosis and Cell Proliferation*, 1998]

Gambar 2.5. Struktur molekul MTT dan reaksi produknya

Pengujian proliferasi dengan MTT cocok untuk sel yang memiliki aktivitas mitokondrial yang cukup tinggi, yaitu galur sel dengan tingkat pertumbuhan eksponensial. Uji ini relatif sederhana, cepat, sensitif dan dapat diadaptasi. Jumlah sel yang diresuspensi ke dalam mikrolat, konsentrasi MTT, dan durasi total pengujian harus distandardisasi untuk setiap jenis sel.

2.7 Pengujian Proliferasi dengan MTS

Uji MTS (*MTS assay*) juga merupakan salah satu pengujian terhadap proliferasi melalui pengukuran viabilitas sel dengan melihat dari aktivitas metaboliknya. Prinsip pengujian MTS yang hampir sama dengan MTT, yaitu dengan pengukuran secara tidak langsung terhadap produk senyawa berwarna yang dihasilkan oleh interaksi reagen dengan sel viabel. MTS merupakan komponen tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium, bentuk garam, MTS] yang biasanya dikombinasi dengan *electron coupling*, misalnya PES (fenazin etosulfat). Komponen tetrazolium MTS direduksi oleh sel membentuk produk formazan berwarna yang larut dalam medium kultur (Gambar 2.6). Jumlah produk formazan diukur serapannya pada panjang gelombang 490 nm, dimana serapan yang dihasilkan ini setara dengan jumlah sel viabel pada kultur.



[Sumber: *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Technical Bulletin*, 2009]

Gambar 2.6. Struktur molekul MTS dan reaksi produknya

Pengujian dengan menggunakan MTS merupakan pengembangan lebih lanjut dari MTT. Pengujian dengan MTS dianggap lebih mudah dibandingkan MTT karena membutuhkan langkah yang lebih sedikit. Formazan ungu yang terbentuk akibat reduksi senyawa MTS dapat larut dalam medium sehingga langkah pelarutan dalam pengujian MTT dapat dihilangkan. Selain itu, pengujian ini memiliki pengerjaan yang sederhana karena tidak memerlukan langkah pemanenan sel ataupun pencucian sel. Kontribusi terbesar dalam proses reduksi

Universitas Indonesia

garam MTS adalah medium kultur dan bahan tambahan lain yang menyebabkan perubahan tak pasti dari jumlah sel selama pengujian proliferasi (Huang, Chen, dan Walker, 2004).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan dari Februari sampai dengan Mei 2012 di Laboratorium *Institute of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), Gedung IASTH lantai 8, Jalan Salemba 4, Jakarta Pusat 10430.

3.2 Perijinan dari Komisi Etik

Persetujuan etis diperoleh dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia pada tahun 2009 untuk payung penelitian yang berjudul “Analisis Pluripotensi dan Ekspresi *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD) pada sel punca kanker payudara” dan pada tahun 2011 untuk payung penelitian yang berjudul “Peran Sel Fibroblast Stroma pada Pluripotensi dan Ketahanan Hidup Sel Punca Kanker Payudara” sebagaimana terlampir pada Lampiran 6.

3.3 Alat

Alat yang digunakan adalah *Biosafety Cabinet* (BSC) [Esco, China], CO₂ Inkubator IL-60160-1491 [Barnstead, USA], mikroskop *inverted* Olympus CKX-41 SF dengan Lensa WHB-10X/20 [Olympus, Japan], mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], lemari pendingin 4°C dan - 20°C [Sanyo, Jepang], pipet mikro 10µl [Biorad, USA], pipet mikro 200 µl dan 1000 µl [Gilson, Perancis], *pipette aid* [Biorad, USA], *microplate reader model 680* [Biorad, USA], *hemocytometer chamber* [Assistant, Jerman], timbangan analitik [Adventurer, USA].

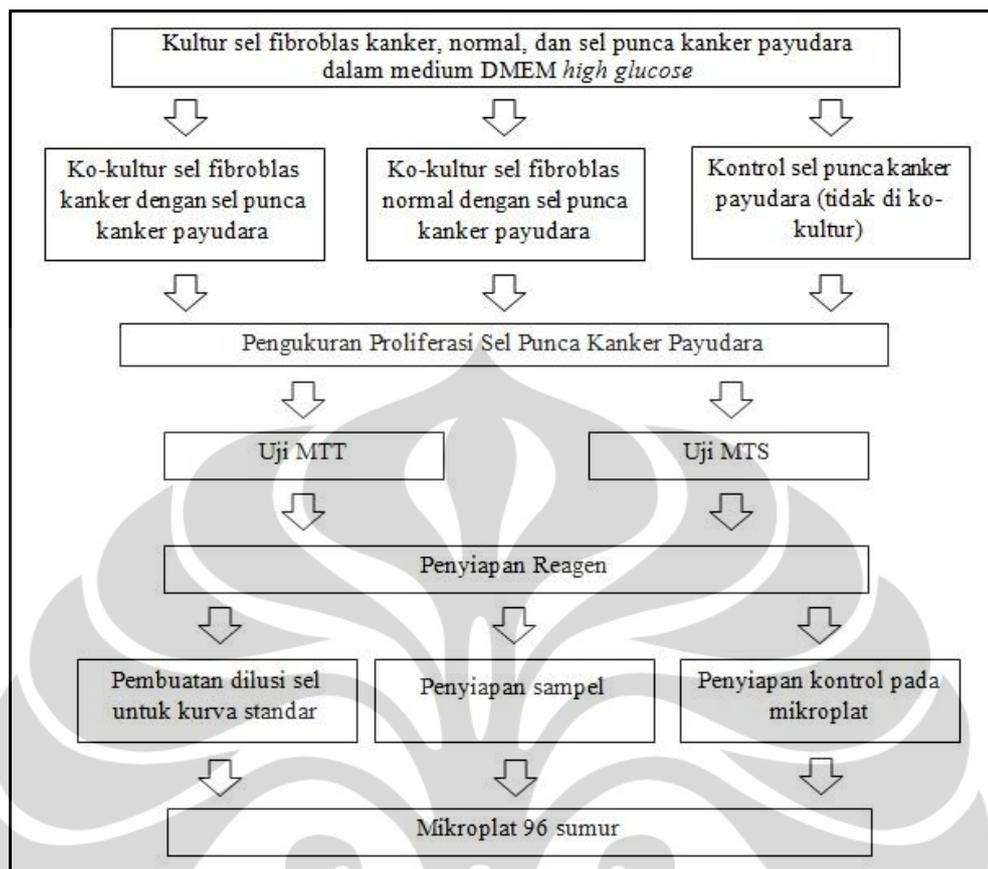
3.4 Bahan

Bahan yang digunakan adalah sel kanker CS09, sebagai sel fibroblas kanker dan sel punca kanker payudara, yang dikoleksi oleh tim peneliti pada payung penelitian tersebut di atas. Suspensi sel tersebut diperoleh dari pengangkatan tumor pasien penderita kanker payudara dari Rumah Sakit Cipto Mangun Kusumo (RSCM) pada bulan Agustus 2009 sampai April 2010 (IHVCB).

Bahan yang digunakan untuk sel fibroblas normal adalah sel *line Baby Hamster Kidney 21 J3* (IHVCB). Bahan lain yang digunakan adalah DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) [SAFCBioscience, USA], HEPES (*N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid*) [Invitrogen, USA], FBS (*Fetal Bovine Serum*) [Invitrogen, USA], penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) [Sigma, USA], natrium bikarbonat 7,5% [Invitrogen, USA], fenol merah [Merck, Jerman], *trypan blue* [Sigma, USA], *steril water for irrigation* [PT Widatra Bhakti, Indonesia], alkohol 96% [Pupick Med., Indonesia], PBS (*Phosphate Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA [Sigma, USA], *collagenase IV* 10 mg/ml [Gibco, USA], *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* [Promega, USA], TACS[®] MTT *Cell Proliferation Assay* (terdiri dari *MTT Reagent* dan *Detergen Reagent*) [Trevigen, USA], pipet serologi 5 ml dan 10 ml [Costar, USA], pipet tips steril [Corning, USA], pipet tips filter steril [Axigen, USA], tabung konikal 15 ml dan 50 ml [Corning, USA], *flask T-25* [Corning, USA], mikroplat 96 sumur [Nunc, Denmark], *syringe* 10 ml [Terumo, Filipina], *syringe filter* 0,22 μ m [Corning, USA], mikroplat 24 sumur [Falcon, USA], mikroplat 24 sumur *low attachment* [Corning, USA], tabung *eppendorf* [Axygen, USA].

3.5 Cara Kerja

Pada penelitian ini, awalnya dilakukan pengkulturan sel punca kanker payudara CS09, sel fibroblas normal BHK 21 J3, dan sel fibroblas kanker CS09 pada medium DMEM *high glucose*. Sel punca kanker payudara yang telah dikultur kemudian diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal BHK 21 J3 dan kanker CS09. Pengaruh sel fibroblas normal dan kanker terhadap proliferasi sel punca kanker payudara diamati dengan uji MTT dan MTS. Skema kerja dan alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema kerja dan alur penelitian

3.5.1 Persiapan Media Kultur DMEM *High Glucose*

Serbuk medium DMEM *high glucose* sebanyak 13,6 g dan 13,9 mg indikator fenol merah dilarutkan hingga homogen dalam satu liter air steril. Larutan tersebut disterilisasi dengan penyaringan dan hasil penyaringan ditambahkan natrium bikarbonat sampai pH-nya sekitar 7,4 yang ditunjukkan dengan timbulnya warna merah pada larutan akibat keberadaan indikator fenol merah. Medium kultur yang telah disaring dan ditambah natrium bikarbonat dialiqout masing-masing 45 ml ke dalam tabung konikal 50 ml kemudian disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C .

DMEM *high glucose* yang akan digunakan dicairkan terlebih dahulu selama 1 jam pada suhu 37°C . DMEM sebanyak 42,25 ml ditambahkan 5 ml FBS 10%, 500 μl penstrep, penyangga HEPES 1M 1 ml dan 1,25 ml natrium bikarbonat (NaHCO_3) lalu kocok homogen secara perlahan untuk mencegah timbulnya buih. Larutan DMEM tersebut kemudian disaring dengan *syringe filter*

0,22 μm . Persiapan media kultur ini dikerjakan pada suhu 25°C dalam kondisi steril.

3.5.2 Pengkulturan Sel Fibroblas dan Sel Punca Kanker Payudara

3.5.2.1 Pengkulturan Sel Fibroblas Normal dan Kanker

Stok sel, yaitu sel CS09 kanker sebagai sel kanker dan sel *line baby hamster kidney* (BHK) 21 J3 sebagai sel normal, yang disimpan dalam nitrogen cair dicairkan dan dijadikan suspensi sel dalam DMEM *high glucose*. Stok sel dijadikan suspensi sel dengan cara dimasukkan ke dalam tabung konikal 15 ml yang telah berisi medium. Suspensi sel disentrifus, kemudian medium diaspirasi untuk menghilangkan kandungan DMSO (dimetil sulfoksida) yang ada dalam *cryomedium*. DMEM *high glucose* ditambahkan pada pelet sel sampai 1 ml kemudian dihomogenkan dengan pemipetan. Suspensi dimasukan ke dalam *flask* T-25 yang telah berisi 6 ml medium dan diinkubasi dalam inkubator dengan kandungan 5% CO_2 dan dilengkapi lampu UV. Medium kultur sel diganti setiap medium terlihat menguning kecoklatan. Medium lama dibuang dengan pemipetan dan kemudian medium baru sebanyak 7 ml dipipet masuk ke dalam *flask* T-25.

Kultur sel yang telah 80 - 90% konfluen harus segera dipanen dengan menggunakan tripsin-EDTA. Medium dalam *flask* dipipet keluar kemudian dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) sebanyak 5 ml. Tripsin-EDTA 1 ml dipipet masuk ke *flask* lalu digoyang-goyangkan sampai tersebar merata. *Flask* diinkubasi selama kurang lebih 7 menit tergantung sampai berapa lama sel yang melekat pada dasar *flask* terlepas. *Flask* yang diinkubasi sesekali diketuk-ketuk dan diamati pelepasan selnya. Pelepasan sel dari dasar *flask* dapat diamati dengan mikroskop. Tripsin-EDTA dalam *flask* yang telah diinkubasi dan telah terlepas selnya dinetralkan dengan medium berserum sebanyak 2 ml. Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung konikal 15 ml dan disentrifus selama 8 menit dengan kecepatan 300 xg. Pelet sel yang terbentuk diresuspensi dengan medium lalu dihitung dengan *hemocytometer*. Perhitungan ini dilakukan dengan terlebih dahulu mencampurkan 80 μl air steril, 10 μl *trypan blue*, dan 10 μl suspensi sel dalam 1 ml medium kemudian 10 μl dari campuran ini dimasukkan ke *hemocytometer*.

3.4.2.2 Pengkulturan Sel Punca Kanker Payudara

Berbeda dengan sel kanker, sel punca kanker payudara dikultur dalam mikroplat *low attachment* 24 sumur. Sel kanker payudara CS09 yang telah dipanen dari *flask* dihitung dengan *hemocytometer* dan kemudian diresuspensikan sampai volume tertentu sehingga tiap sumur mikroplat berisi 500.000 sel punca kanker payudara dalam 1 ml medium DMEM *high glucose*. Sel punca yang telah membentuk *mammospheres* dan telah konfluen dapat dipanen dengan cara menghomogenkan medium dalam sumur dan dipindahkan ke tabung konikal 15 ml. Suspensi sel ini disentrifus dan dihitung dengan menggunakan *hemocytometer*. Sel punca kanker payudara yang berasal dari sel kanker payudara CS09 memiliki penanda permukaan berupa $CD44^+/CD24^-$ yang telah dibuktikan dengan spektrofлуorometer.

3.4.3 Pengko-kulturan Sel Punca dengan Sel Fibroblas Kanker Payudara

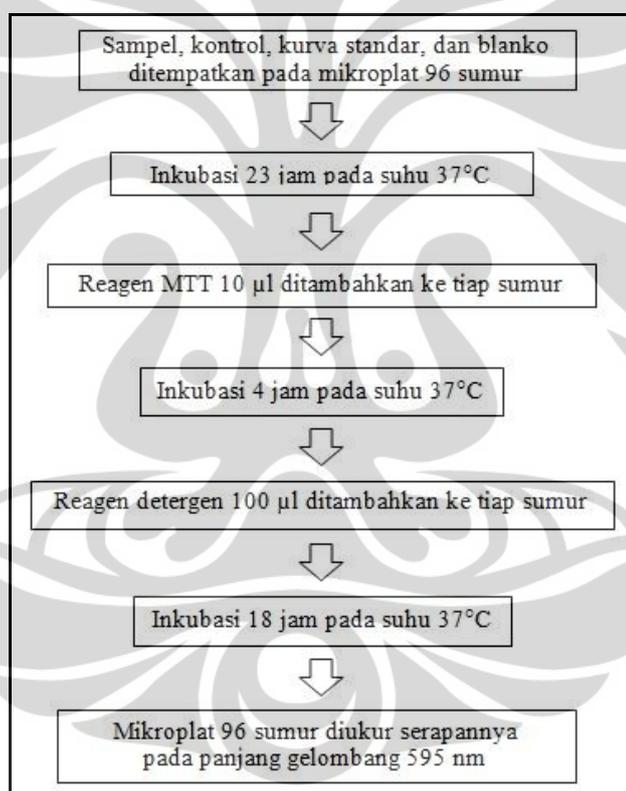
Feeder layer sel fibroblas kanker dan normal disiapkan dengan mengkultur suspensi sel fibroblas kanker CS09 dan sel *line* fibroblas BHK 21 J3 secara triplo dengan jumlah 200.000 sel/sumur pada mikroplat 24 sumur sampai 70-80% konfluen. Sebanyak 30.000 sel punca kanker payudara CS09 dengan penanda permukaan $CD44^+/CD24^-$ diresuspensikan ke dalam 1 ml medium DMEM *high glucose* dan diko-kultur pada plat yang telah memiliki *feeder layer*. Sel punca kanker CS09 dengan jumlah yang sama ditanam pada mikroplat 24 sumur tanpa *feeder layer* sebagai kontrol. Sebanyak 30.000 sel punca kanker payudara CS09 juga diresuspensi ke dalam 100 μ l medium untuk selanjutnya dimasukkan ke mikroplat 96 sumur dan diuji dengan MTT dan MTS.

Pada hari kedua dan hari keempat dilakukan pemanenan dengan terlebih dahulu mengaspirasi medium yang sebelumnya telah dihomogenkan dengan pipet secara perlahan ke tabung eppendorf. *Collagenase IV* 10 mg/ml sebanyak 200 μ l ditambahkan pada sumur dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu 25°C. *Collagenase IV* dalam sumuran kemudian dihomogenkan perlahan, dipipet, dan disentrifus bersamaan dengan medium yang telah diaspirasi dalam tabung eppendorf. *Feeder layer* sel fibroblas akan tertinggal pada plat. Pelet yang

terbentuk pada tabung *ependorf* diresuspensikan dalam 100 μ l medium lalu dilakukan pengujian MTT atau MTS.

3.4.4 Pengujian Proliferasi dengan MTT

TACS[®] *MTT Cell Proliferation Assay* terdiri dari dua buah reagen, yaitu reagen MTT dan reagen detergen. Reagen MTT terlebih dahulu *dialiquot* pada tabung *ependorf* kemudian disimpan dalam pendingin 4°C. Reagen detergen juga disimpan dalam pendingin 4°C dan dihangatkan selama 5 menit pada penangas air 37°C ketika akan digunakan. Gambar 3.2 menunjukkan skema kerja dengan pengujian MTT.



Gambar 3.2. Skema kerja pengujian MTT

Suspensi sel punca kanker payudara CS09 sampel dan kontrol yang dibuat triplo didistribusikan 100 μ l tiap sumur pada mikroplat 96 sumur, termasuk 3 blanko yang terdiri dari medium saja. Selain sampel dan kontrol, pengujian MTT juga membutuhkan kurva standar. Kurva standar dibuat dari suspensi sel yang didilusikan dari 75.000 sampai 1172 sel dalam 100 μ l medium dan ditempatkan

pada mikrolat. Mikrolat diinkubasi semalaman lalu ditambahkan 10 µl reagen MTT ke masing-masing sumur. Mikrolat dikembalikan ke inkubator selama 4 jam atau sampai terlihat kristal ungu di bawah mikroskop kemudian 100 µl reagen detergen ditambahkan ke semua sumur (jangan dikocok). Mikrolat didiamkan dalam tempat gelap dengan suhu 37°C semalaman. Penutup plat dipindahkan dan serapan dari tiap sumur diukur, termasuk blanko, pada panjang gelombang 595 nm dengan pembaca mikrolat. Nilai serapan yang didapat dari pengukuran kemudian dikurangi serapan rata-rata blanko. Penentuan jumlah sel sampel ditentukan dengan menggunakan regresi linier dari kurva standar.

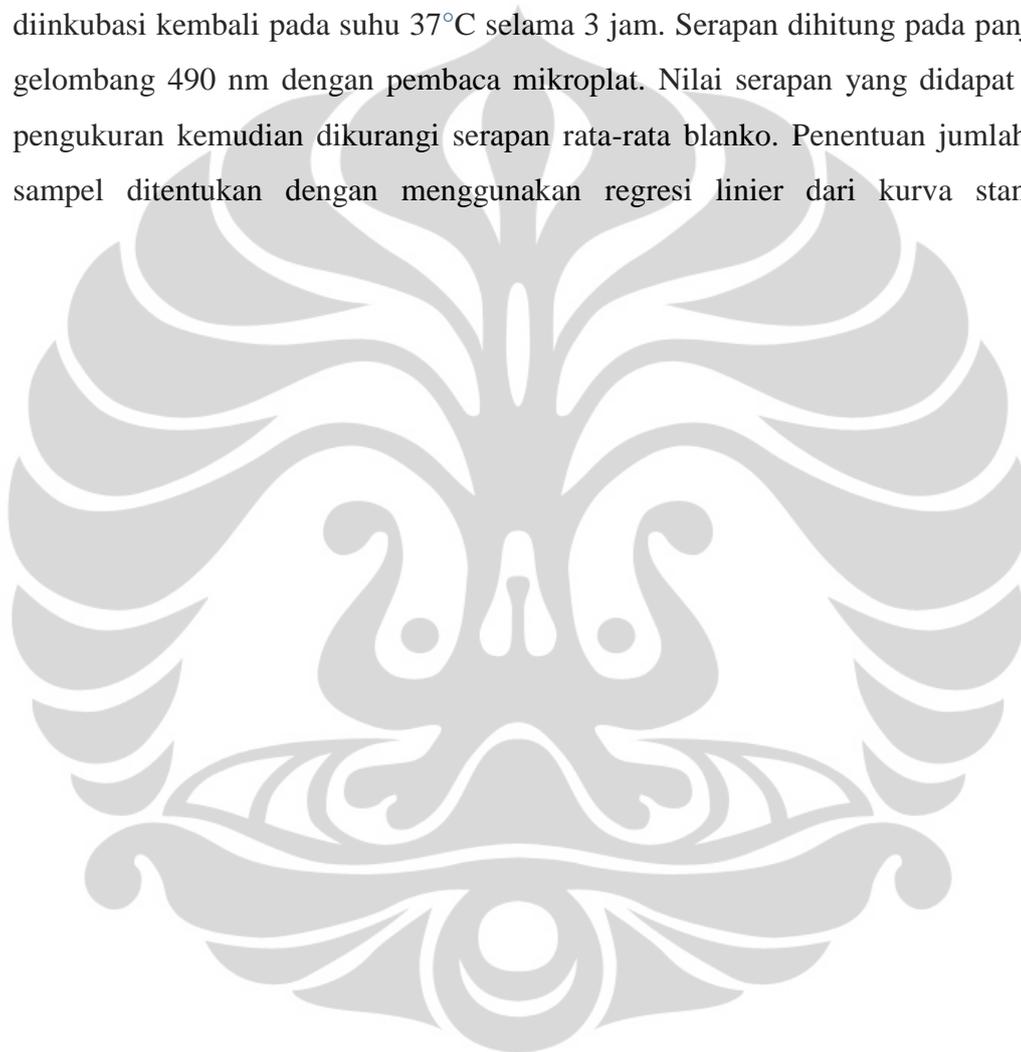
3.4.5 Pengujian Proliferasi dengan MTS Assay

Uji MTS dilakukan dengan menggunakan *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* kit yang hanya terdiri dari satu reagen, yaitu reagen *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Reagen ini dicairkan selama 90 menit pada temperature ruangan atau 10 menit dalam penangas air 37°C untuk mencairkan larutan berukuran 20 ml secara sempurna. Reagen yang telah mencair dialiqout dalam tabung *ependorf* kemudian disimpan dalam pendingin -20°C. Reagen yang digunakan dicairkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Gambar 3.3 memperlihatkan skema kerja pengujian proliferasi dengan MTS.



Gambar 3.3. Skema kerja pengujian MTS

Suspensi sel punca sampel dan kontrol yang dibuat triplo didistribusikan 100 μ l tiap sumur pada mikroplat 96 sumur, termasuk 3 kontrol yang terdiri dari medium saja (blanko). Suspensi sel yang didilusikan dari 75.000 sampai 1172 sel dalam 100 μ l medium juga ditempatkan pada mikroplat sebagai kurva standar. Mikroplat diinkubasi semalaman lalu ditambahkan Reagen *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* sebanyak 20 μ l ke tiap sumur. Mikroplat diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 3 jam. Serapan dihitung pada panjang gelombang 490 nm dengan pembaca mikroplat. Nilai serapan yang didapat dari pengukuran kemudian dikurangi serapan rata-rata blanko. Penentuan jumlah sel sampel ditentukan dengan menggunakan regresi linier dari kurva standar.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

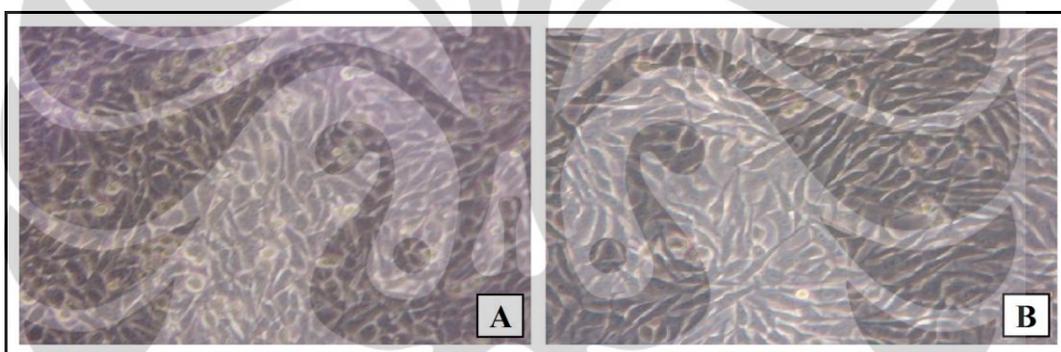
4.1 Pembuatan Medium Kultur

Medium kultur sel harus disesuaikan dengan jenis sel yang dikultur. Medium yang digunakan dalam pengkulturan sel fibroblas normal dari sel *line* BHK 21 J3, sel fibroblas kanker CS09, dan sel punca kanker payudara CS09 dalam penelitian ini adalah DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) *high glucose* yang memiliki bentuk awal berupa serbuk. Pembuatan larutan blanko DMEM *high glucose* harus memperhatikan kondisi pH. Sebagian besar sel *line* tumbuh pada pH 7,4 – 7,7 (Freshney, 2005). Kondisi pH tersebut dipertahankan dengan adanya kandungan NaHCO_3 , dan CO_2 . Keberadaan CO_2 dari atmosfer dapat menurunkan pH dan sebaliknya keberadaan NaHCO_3 dapat meningkatkan pH. Selain dengan kandungan NaHCO_3 dan CO_2 , pH juga dijaga dengan bantuan penyangga HEPES. Penentuan pH dilakukan dengan bantuan fenol merah sebagai indikator dimana pada pH 7,4 akan timbul warna merah.

DMEM *high glucose* untuk kultur fibroblas dan sel punca kanker payudara digunakan dengan beberapa modifikasi. Medium kultur yang digunakan, selain mengandung DMEM *high glucose* juga mengandung komponen lain yang mendukung pertumbuhan kultur. Komponen tersebut terdiri dari *Fetal Bovine Serum* (FBS), sodium bikarbonat, penyangga HEPES, dan penstrep. Medium dalam tabung konikal dikeluarkan dari *freezer* dan kemudian didiamkan sampai mencair kemudian ditambahkan FBS 5 ml yang mengandung faktor pertumbuhan, untuk membantu proliferasi, dan faktor adhesi untuk membantu perlekatan sel pada *flask*. Penisilin-streptomisin (penstrep) sebanyak 500 μl juga ditambahkan untuk mencegah kontaminasi. NaHCO_3 sebanyak 1,25 ml dan penyangga HEPES sebanyak 1 ml ditambahkan untuk menjaga pH medium yang sesuai untuk pertumbuhan kultur. Medium dihomogenkan dengan cara membolak-balikan tabung secara perlahan untuk menghindari timbulnya buih, kemudian disaring dengan *syringe filter* 0,22 μm . Medium DMEM yang siap pakai disimpan di pendingin 4°C dan sebelum digunakan harus dihangatkan terlebih dahulu pada suhu ruang.

4.2 Penyiapan Kultur Sel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel kanker payudara CS09 yang diambil dalam waktu kurang lebih satu jam setelah operasi pengangkatan tumor untuk mengurangi resiko sel mati sebelum dilakukan isolasi. Sel tersebut disimpan pada keadaan dingin (2°C – 5°C) untuk diproses oleh tim IHVCB-UI sebelum dapat dikultur dengan menggunakan medium DMEM *high glucose* pada *flask* T-25 dan mikroplat 24 sumur *low attachment*. Pengkulturan dilakukan dengan terlebih dahulu menghilangkan DMSO dari sel, yang sebelumnya disimpan dalam *cryomedium* pada nitrogen cair. *Cryomedium* mengandung 50% FBS, 40% medium *blank*, dan 10% DMSO. Keberadaan DMSO dalam kultur dapat bersifat toksik bagi sel sehingga sebaiknya dihilangkan terlebih dahulu sebelum mengkultur sel.



Keterangan : A. Kultur sel fibroblas CS09 kanker dalam medium DMEM; B. Kultur sel *line* BHK 21 J3 dalam medium DMEM.

Gambar 4.1. Pertumbuhan sel fibroblas kanker dan normal pada *flask* T-25 dengan perbesaran 400 kali

Sel yang dikultur dalam *flask* T-25 adalah sel fibroblas kanker yang berasal dari sel kanker CS09 dan sel fibroblas normal yang berasal dari *baby hamster kidney* (BHK) 21 J3 (Gambar 4.1). Sel *line* BHK 21 J3 digunakan sebagai pengganti sel fibroblas normal payudara manusia yang tidak berhasil didapatkan karena belum adanya pasien operasi *mammoplasty*. Sel *line* ini berasal dari ginjal hamster berusia satu hari. Stok sel tersebut masing-masing dikultur dalam medium DMEM *high glucose* sebanyak 7 ml. Pergantian medium dilakukan tiga hari sekali atau sampai medium terlihat menguning agar pertumbuhan sel terjaga dengan baik. Pertumbuhan sel kanker payudara sangat

cepat sehingga dilakukan proses subkultur beberapa kali agar pertumbuhan sel tidak terhambat. Subkultur juga dilakukan untuk memperbanyak jumlah kultur sel. Kultur yang sudah konfluen harus dipanen agar mencegah kematian sel yang dikarenakan tidak adanya lagi ruang bagi sel untuk tumbuh.

Pengkulturan sel kanker payudara juga dilakukan pada mikroplat 24 sumur *low attachment* dalam 1 ml medium DMEM *high glucose* per sumur. Mikroplat *low attachment* dapat menjaga sel tetap dalam keadaan tidak menempel sehingga mencegah diferensiasi sel punca kanker payudara (Gambar 4.2). Sel punca yang tidak berdiferensiasi dapat membentuk gerombolan dan tidak melekat melainkan melayang pada medium yang disebut *mammospheres*. Penggantian medium dilakukan jika medium kultur terlihat menguning. *Mammospheres* yang telah konfluen dapat dipanen dan kemudian diko-kultur.

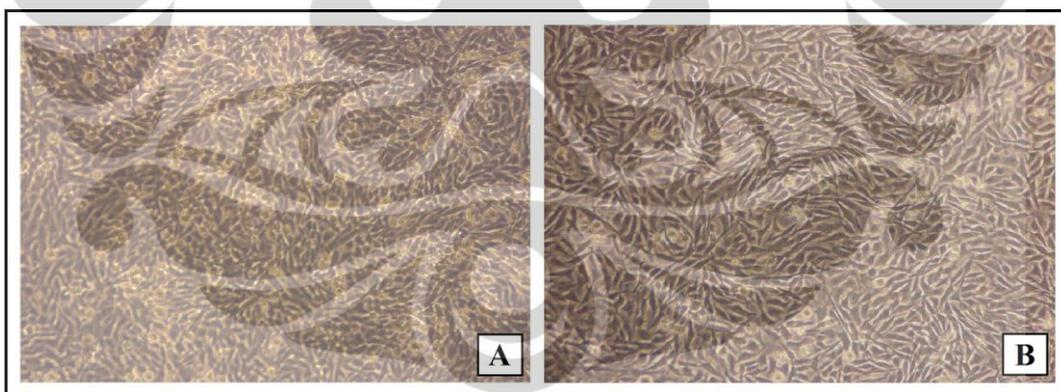


Gambar 4.2. *Mammospheres* dalam mikroplat *low attachment* dengan perbesaran 400 kali

Ada beberapa hal yang harus diperhatikan dalam proses kultur sel, yaitu suhu dan pH. Suhu dan pH kultur disesuaikan dengan kondisi *in vivo*. Suhu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal kultur sel adalah 37°C, sesuai dengan suhu tubuh. Selain suhu, kondisi pH juga harus dijaga antara 7,4 – 7,7 dengan cara memasok kandungan CO₂ eksternal. Kandungan CO₂ eksternal bersama dengan adanya NaHCO₃ dan HEPES dalam medium kultur dapat mempertahankan pH agar tetap pada kisaran optimal untuk pertumbuhan kultur.

4.3 Pengko-kulturan Sel Punca dengan Sel Fibroblas Kanker Payudara

Sel fibroblas kanker CS09 dan normal BHK 21 J3 dipanen dengan menggunakan tripsin-EDTA kemudian dihitung dengan *hemocytometer*. Sebanyak 200.000 sel fibroblas baik normal maupun kanker ditanam sebagai *feeder layer* dalam mikroplat 24 sumur sampai 70 - 80% konfluen (Gambar 4.3). Sel punca kanker CS09 dipanen dan dihitung lalu ditanam sebanyak 30.000 sel tiap sumur pada plat yang telah memiliki *feeder layer* sel fibroblas BHK 21 J3, sel fibroblas kanker CS09, dan juga pada plat tanpa *feeder layer* sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan sampai pertumbuhan optimal dari ko-kultur, dimana pada penelitian ini dilakukan pengambilan data pada hari kedua dan keempat. Perkembangan ko-kultur harus diamati setiap hari karena kultur yang terlalu konfluen dapat mengakibatkan *feeder layer* terlepas dari dasar mikroplat. Sel punca kanker payudara di dalam kondisi kultur *in vitro* ditandai dengan sel yang memiliki morfologi bulat sedangkan sel fibroblas menjalar pada dasar plat. Sel fibroblas yang terlepas dari dasar plat akan berbentuk sama seperti sel punca sehingga sulit dibedakan satu sama lain. Pengamatan kultur ini sangat penting untuk menentukan hari pengambilan data uji proliferasi.



Keterangan : A. *Feeder layer* sel fibroblas CS09 kanker; B. *Feeder layer* sel fibroblas normal

Gambar 4.3. *Feeder layer* sel fibroblas untuk ko-kultur dengan perbesaran 100 kali

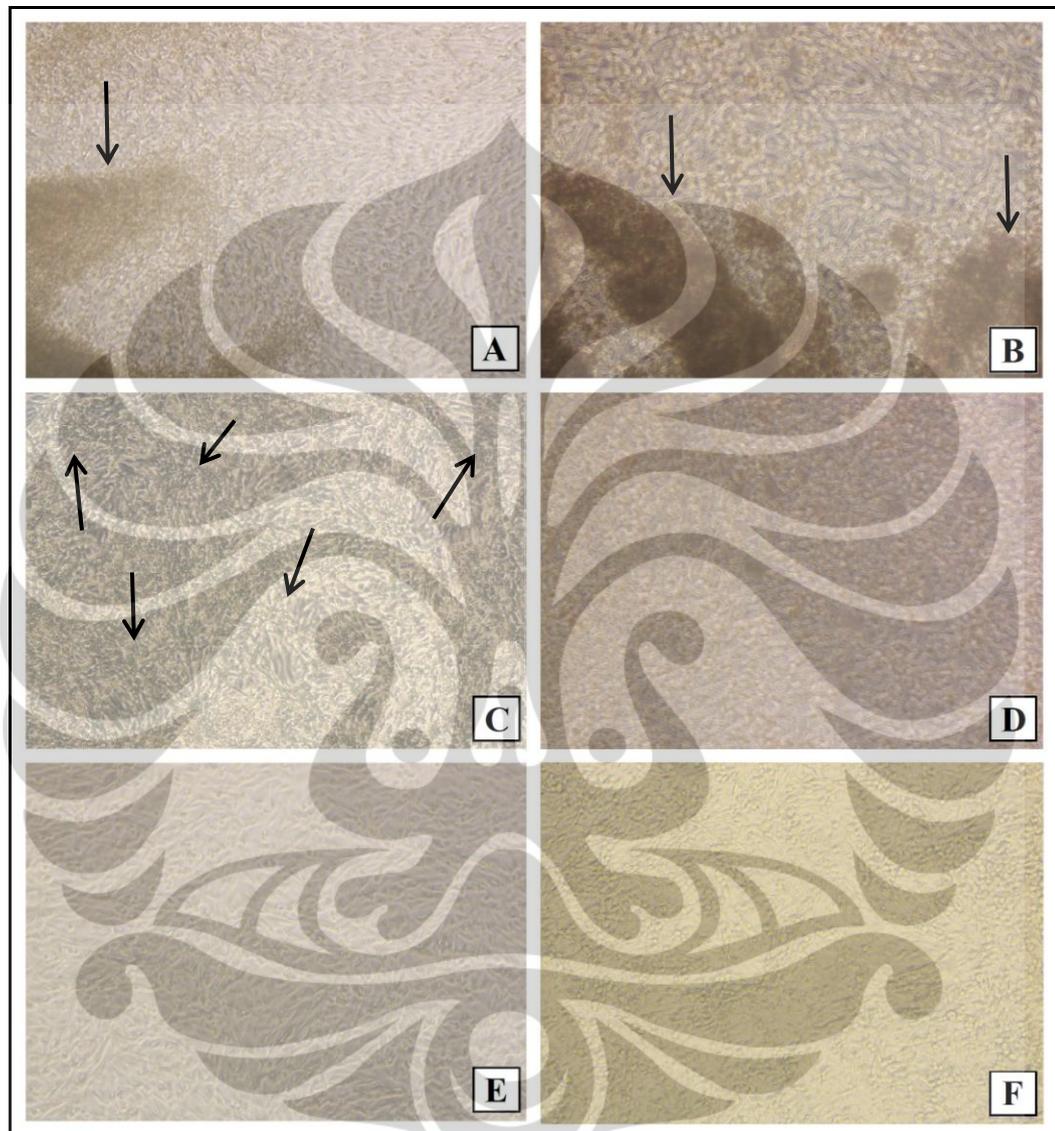
Pengamatan secara mikroskopik hasil ko-kultur sel punca kanker dengan sel fibroblas yang dilakukan pada hari kedua dan keempat menunjukkan adanya perbedaan (Gambar 4.4). Pengamatan hari kedua sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09 terlihat banyak *mammospheres* yang

menempel pada *feeder layer*. Pada hari keempat *mammospheres* semakin banyak dan padat. Berbeda dengan hasil ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas kanker, pengamatan pertumbuhan sel punca kanker yang diko-kultur dalam sel fibroblas BHK 21 J3 tidak memperlihatkan banyak *mammospheres* pada hari kedua maupun hari keempat. Pada pengamatan hari kedua, keberadaan *mammospheres* pada *feeder layer* terlihat menyebar pada *feeder layer* dan densitasnya tidak padat. Pada pengamatan hari keempat, sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 memperlihatkan sel-sel yang menghitam dan menyebar pada *feeder layer*. Kondisi ini memperlihatkan *feeder layer* fibroblas normal tidak mampu mempertahankan jumlah *mammospheres*. Sel punca kanker CS09 pada plat kontrol semakin banyak yang berdiferensiasi dari hari kedua ke hari keempat, terlihat dari banyaknya sel yang menjalar di dasar plat namun tidak terlihat adanya *mammospheres*.

Mammospheres memiliki karakteristik sel punca berupa kemampuan diferensiasi dan *self-renewal*. Ponti dan rekan-rekannya (2005) berhasil mengisolasi sel punca dalam keadaan tidak terdiferensiasi (*mammospheres*) dan memperlihatkan adanya ekspresi CD44⁺/CD24⁻ (95 - 98%) pada kultur sel. Fenotip CD44⁺/CD24⁻ dimiliki oleh subpopulasi sel kanker payudara dengan sifat sel punca (Al-Hajj et al., 2003). Meningkatnya jumlah *mammospheres* pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker membuktikan bahwa *feeder layer* sel fibroblas kanker dapat menjaga sifat kepuncaan sel punca kanker dilihat dari kemampuannya mempertahankan jumlah *mammospheres*. Sebaliknya, berkurangnya jumlah *mammospheres* pada ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas normal mengindikasikan menurunnya sifat kepuncaan dari sel punca kanker payudara.

Pengamatan secara mikroskopik dapat memperlihatkan perbedaan kemampuan mempertahankan keberadaan *mammospheres* dengan dua kondisi ko-kultur yang berbeda, namun sulit memprediksi tingkat proliferasi punca kanker CS09. Proliferasi sel dapat ditentukan dengan menghitung jumlah sel viabel yang ada pada kultur dengan pengujian MTT dan MTS. Sel punca kanker payudara terlebih dahulu dipanen dengan mengaspirasi medium dan memaparkan *collagenase IV*. *Collagenase IV* memiliki kemampuan untuk melepas penempelan

sel punca kanker payudara pada *feeder layer* namun tidak adekuat untuk melepas penempelan sel fibroblas pada dasar sumur mikroplat sehingga sel punca kanker dapat dipanen tanpa ikut mengangkat *feeder layer*.



Keterangan : A. Pengamatan ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas kanker pada hari kedua; B. Pengamatan kontrol sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas kanker pada hari keempat; C. Pengamatan ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas normal pada hari kedua; D. Pengamatan ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas normal pada hari keempat; E. Pengamatan kontrol sel punca kanker payudara pada hari kedua; F. Pengamatan kontrol sel punca kanker payudara pada hari keempat. Tanda panah menunjukkan *mammospheres*.

Gambar 4.4. Pertumbuhan ko-kultur sel punca kanker payudara dengan sel fibroblas kanker dengan perbesaran 100 kali

4.4 Pengujian Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara

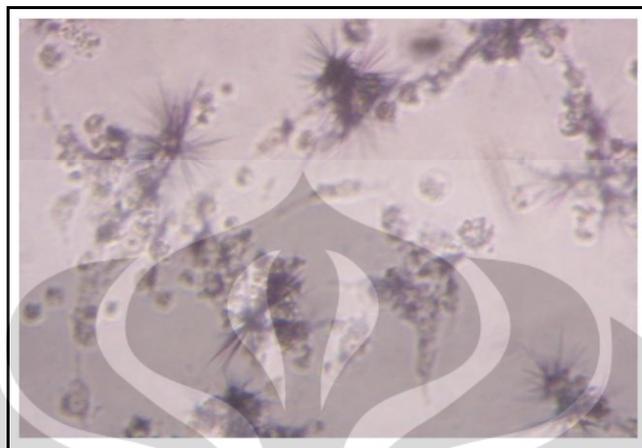
Uji MTT dan MTS memiliki prinsip kerja yang sama yaitu menentukan proliferasi sel dengan mengukur aktivitas metaboliknya. Dalam pelaksanaannya, kedua uji ini memerlukan optimasi terlebih dahulu untuk mendapatkan hasil terbaik. Optimasi yang dilakukan meliputi waktu inkubasi dan jumlah sel yang digunakan dalam pengujian. Waktu inkubasi dioptimasi dengan cara menilai linearitas dari kurva standar yang dihasilkan dalam waktu inkubasi tertentu. Waktu inkubasi yang menghasilkan linearitas tertinggi digunakan dalam pengujian. Pada pengujian MTS dapat dilakukan pembacaan serapan mikroplat berulang sehingga optimasi lebih mudah dilakukan. Waktu inkubasi yang digunakan untuk uji MTT adalah 4 jam, sedangkan uji MTS 3 jam. Jumlah sel yang digunakan dalam pengujian harus berada dalam bagian linear pada kurva standar yang telah dioptimasi. Jumlah sel yang diambil peneliti adalah 30.000 sel dimana jumlah ini berada pada bagian linear kurva standar yang telah dioptimasi.

Kondisi reagen MTT dan MTS juga harus diperhatikan karena adanya pengaruh kondisi dan lamanya penyimpanan terhadap serapan senyawa formazan. Reagen MTT dan MTS bersifat sensitif terhadap cahaya sehingga reagen harus disimpan dalam botol coklat atau tempat yang gelap. Perubahan warna reagen dapat terjadi apabila terpapar cahaya dari luar selama beberapa jam. Peningkatan pembacaan serapan dapat terjadi akibat perubahan warna ini, namun tidak merubah kualitas reagen.

4.5.1 Pengujian MTT

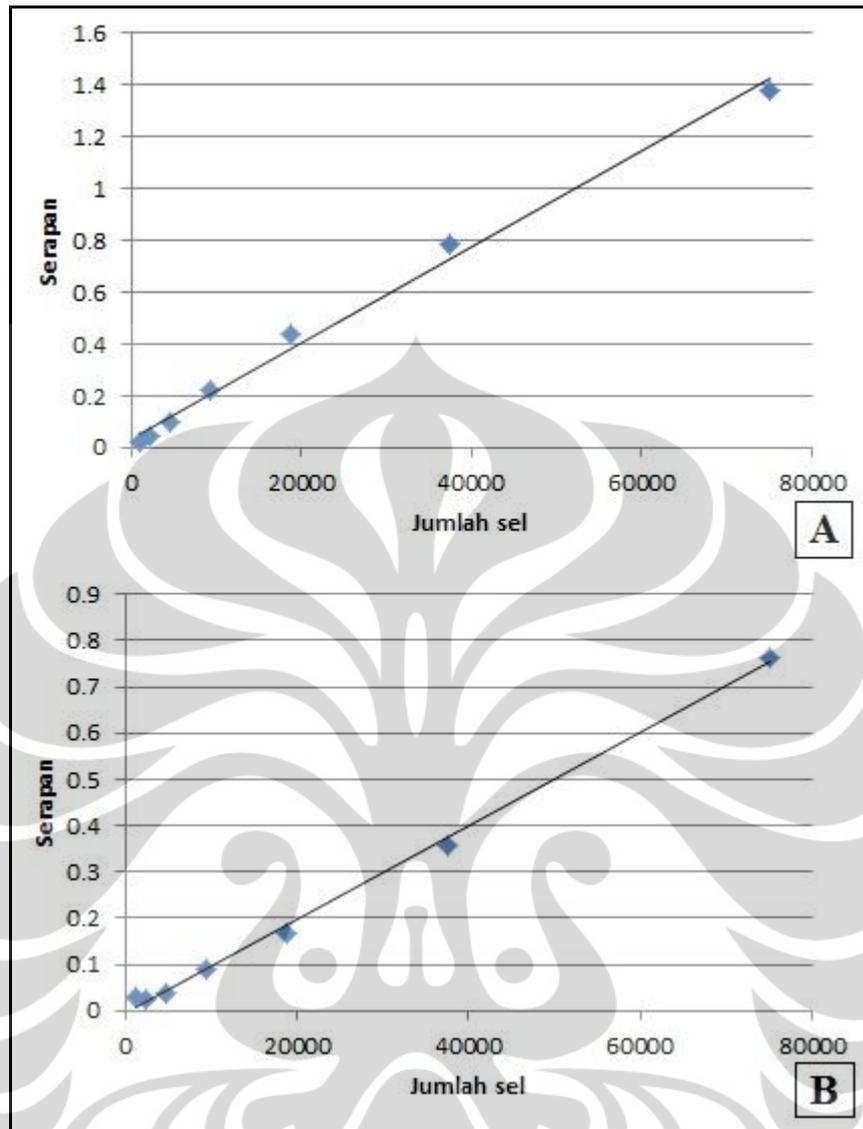
Uji MTT merupakan salah satu metode pengukuran proliferasi sel berdasarkan aktivitas mitokondrial yang merupakan suatu ciri khas sel viabel. Sel viabel direaksikan dengan garam tetrazolium yang berwarna kuning, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium bromida (MTT) sebanyak 10 µl akan memproduksi formazan ungu setelah diinkubasi 4 jam (Gambar 4.5) sebagai akibat dari aktivitas metabolik sel yang mereduksi pereaksi MTT. Formazan yang tidak larut dalam medium dapat dilarutkan dengan 100 µl pereaksi detergen untuk kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 595 nm. Pengukuran

jumlah sel pada sampel dapat dilakukan dengan membuat kurva standar bersamaan dengan sampel dan kontrol.



Gambar 4.5. Kristal formazan dengan perbesaran 400 kali

Kurva standar dibuat dari beberapa konsentrasi suspensi sel punca kanker payudara. Suspensi sel yang digunakan dimulai dari konsentrasi 75.000 sel per 100 μl kemudian dilakukan dilusi kelipatan dua sampai konsentrasinya 1.172 sel per 100 μl sehingga didapat 7 konsentrasi untuk kurva standar. Jumlah sel yang digunakan untuk kurva standar didapat dari hasil optimasi. Setiap konsentrasi disuspensi dalam medium 100 μl kemudian dipipet ke mikroplat 96 sumur. Suspensi sel dalam plat sebaiknya diinkubasi semalaman dalam inkubator 37°C karena sel membutuhkan waktu untuk memulihkan diri dan menempel pada substrat. Suspensi sel yang telah diinkubasi tersebut kemudian direaksikan dengan pereaksi MTT selama 4 jam dan dilarutkan dengan peraksi detergen selama 18 jam pada suhu 37°C. Kurva standar pada pengamatan hari kedua menghasilkan persamaan garis $y = 1,8511 \cdot 10^{-5} x + 0,0336$ dengan nilai $R = 0,9960$, sedangkan pada pengamatan hari keempat menghasilkan persamaan garis $y = 1,0083 \cdot 10^{-5} x - 0,0037$ dengan nilai $R = 0,9986$ (Gambar 4.6). Persamaan garis kurva standar digunakan untuk menentukan jumlah sel pada sampel dan kontrol sel punca kanker payudara.



Keterangan : A. Kurva standar uji MTT pada pengamatan ko-kultur hari kedua; B. Kurva standar uji MTT pada pengamatan ko-kultur hari keempat.

Gambar 4.6. Kurva standar uji MTT

Sampel yang digunakan berupa sel punca kanker payudara yang dikultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09 dan BHK 21 J3. Sel punca kanker yang telah dipanen, disentrifus, dan disuspensikan dalam medium sebanyak 100 μ l kemudian dimasukkan ke dalam mikrolat 96 sumur. Hal yang sama juga dilakukan pada kontrol. Kontrol yang digunakan dalam pengujian ini adalah sel punca kanker payudara yang dikultur pada mikrolat tanpa adanya *feeder layer*. Pengujian sampel, kontrol, dan kurva standar dilakukan dalam mikrolat 96 sumur yang sama untuk memastikan bahwa sampel, kontrol, dan

kurva standar mendapatkan perlakuan yang sama, baik dalam hal lamanya inkubasi, suhu inkubator, dan kualitas reagen. Lama inkubasi sampel dengan reagen MTT yang dilakukan penulis yaitu selama 4 jam dan lama pelarutan formazan dengan reagen detergen selama 18 jam pada suhu 37°C. Pada pengujian ini digunakan blanko pembacaan serapan yang berupa medium saja (tanpa sel), dengan nilai serapan pada pengukuran hari kedua adalah 0,080 dan pada hari keempat adalah 0,094. Nilai serapan yang digunakan adalah selisih nilai serapan yang didapat dikurangi dengan nilai serapan blanko (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Hasil pengukuran serapan uji MTT

	Serapan	
	D2	D4
FK	0,273	0,216
	0,304	0,231
	0,203	0,221
FN	0,114	0,029
	0,099	0,048
	0,154	0,115
K	0,068	0,041
	0,058	0,084
	0,035	0,093

Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur, D2 = Pengukuran sampel hari kedua, D4 = Pengukuran sampel hari keempat.

Seluruh sel punca kanker, baik diko-kultur ataupun tidak, yang ditanam pada mikroplat biasa mengalami penurunan jumlah sel. Hal ini terlihat dari rata-rata jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dan kontrol sel punca kanker payudara pada mikroplat memiliki jumlah yang lebih rendah daripada jumlah sel awal yang dimasukkan ke mikroplat, yaitu sebanyak 35.550 sel/sumur. Kondisi ini disebabkan terjadinya diferensiasi sel punca kanker payudara sebagaimana yang terlihat secara mikroskopik pada dasar mikroplat kontrol, dimana terdapat banyak sel punca kanker yang menempel dan menjalar pada dasar sumur mikroplat. Selain itu, pengaruh selektif dari lingkungan mikro juga

dapat mengakibatkan menurunnya jumlah sel punca kanker payudara. Sel kanker yang masuk ke dalam lingkungan itu terpapar tekanan lingkungan dan pada akhirnya terjadi seleksi sel-sel kanker yang memiliki kemampuan tetap tumbuh menghadapi tantangan tersebut (Chiang dan Massague, 2008).

Tabel 4.2. Jumlah sel punca kanker payudara diukur dengan uji MTT

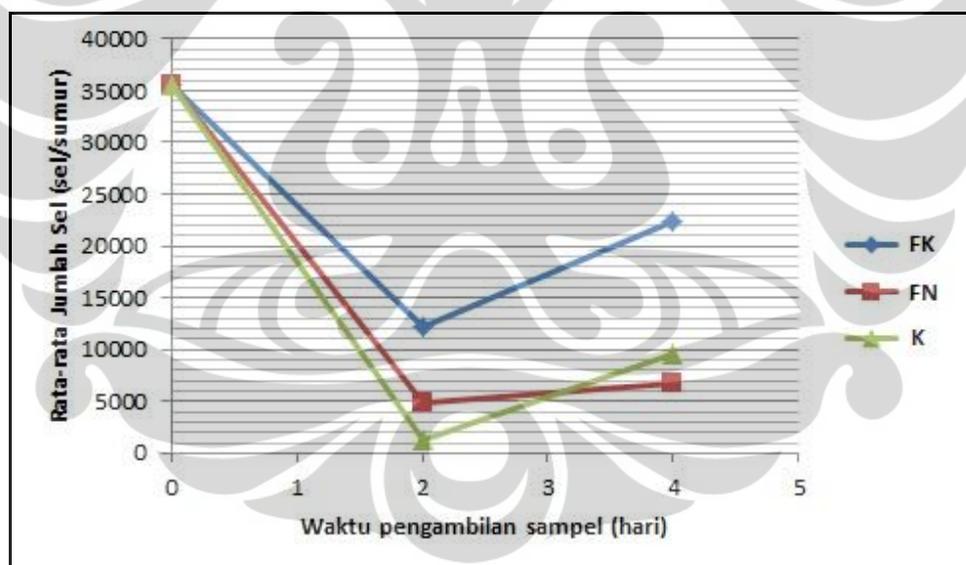
	D2		D4	
	Jumlah (sel/sumur)	Rata-rata (sel/sumur)	Jumlah (sel/sumur)	Rata-rata (sel/sumur)
FK	12.933	12.231	21.789	22.450
	14.608		23.276	
	9.151		22.285	
FN	4.343	4.793	3.243	6.714
	3.533		5.127	
	6.504		11.772	
K	1.858	1.311	4.433	9.574
	1.318		8.698	
	756		9.590	

Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur, D2 = Pengukuran sampel hari kedua, D4 = Pengukuran sampel hari keempat.

Tabel 4.2 menunjukkan jumlah sel rata-rata sampel dan kontrol pada pengamatan hari kedua dan keempat. Pada pengamatan hari kedua, rata-rata jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker adalah sebanyak 12.933 sel/sumur, lebih tinggi dari pada rata-rata jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal, yaitu sebanyak 4.793 sel/sumur, dan juga kontrol sel punca kanker, yaitu sebanyak 1.311 sel/sumur. Perbedaan jumlah tersebut menunjukkan bahwa proliferasi sel punca kanker payudara lebih tinggi ketika diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09 dibanding sel fibroblas BHK 21 J3. Sel fibroblas kanker menyediakan permukaan yang lebih sesuai bagi sel punca kanker payudara untuk berproliferasi. Jumlah rata-rata sel punca kanker pada plat kontrol memperlihatkan angka paling rendah dibandingkan plat ko-kultur. Hal tersebut menunjukkan bahwa kondisi ko-kultur dapat mendukung pertumbuhan sel punca kanker payudara.

Universitas Indonesia

Hasil pengamatan hari keempat menunjukkan peningkatan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara pada semua sampel. Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09 pada hari keempat sebanyak 22.450 sel/sumur menunjukkan peningkatan yang berarti dibandingkan jumlah rata-ratanya pada pengamatan hari kedua. Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 menunjukkan peningkatan dengan jumlah rata-rata 6.714 sel/sumur dan pada kontrol terukur 9.574 sel/sumur. Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur pada fibroblas kanker CS09 memperlihatkan jumlah yang jauh melebihi sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 dan kontrol. Pada pengamatan hari keempat, jumlah sel punca kanker payudara pada kontrol melebihi jumlah pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3. Hal ini memperlihatkan adanya inhibisi proliferasi yang disebabkan oleh lingkungan mikro sel fibroblas normal.



Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur.

Gambar 4.7. Perkembangan sel punca kanker payudara yang diukur dengan uji MTT

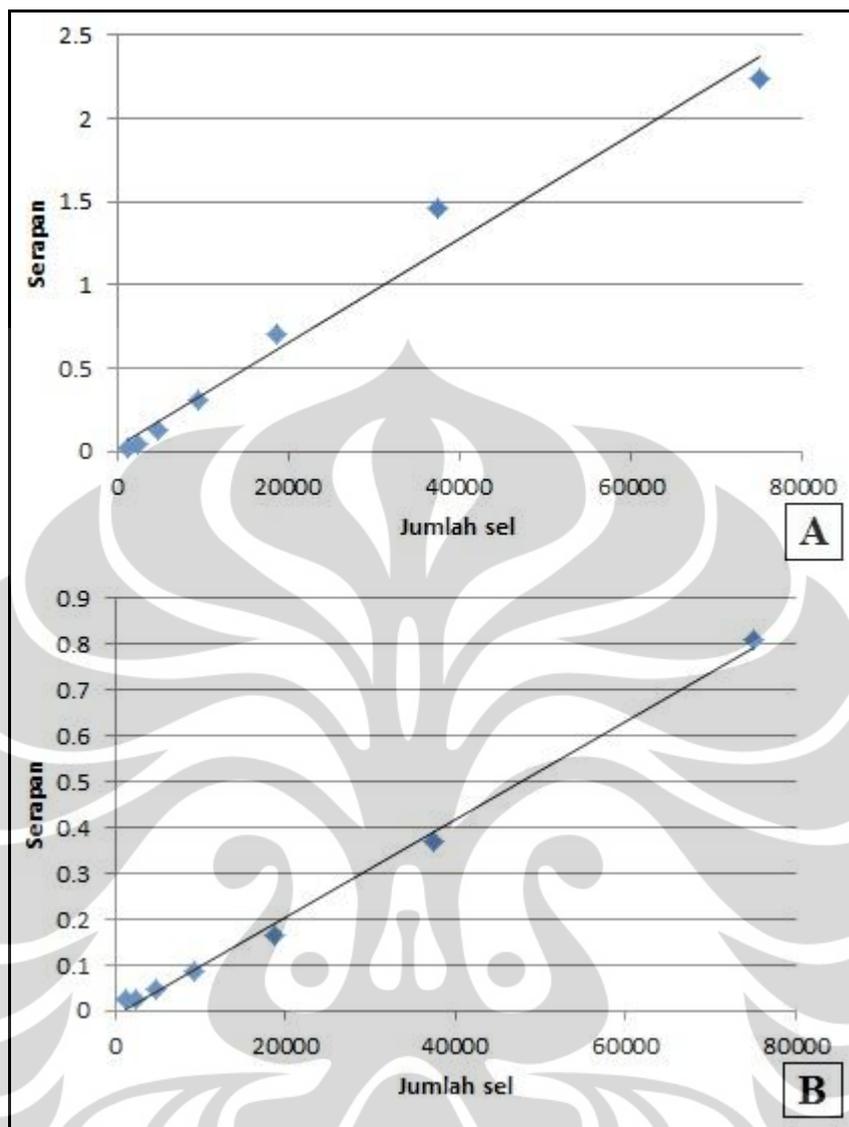
Data pengujian hari kedua dan keempat menunjukkan proliferasi sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker selalu lebih tinggi

dibandingkan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal maupun kontrol (Gambar 4.7). Pertumbuhan sel punca kanker payudara pada lingkungan sel fibroblas normal cukup terlihat pada hari kedua, namun pada hari keempat menunjukkan penurunan proliferasi.

4.5.2 Pengujian MTS

Uji MTS merupakan salah satu metode pengukuran proliferasi sel berdasarkan aktivitas metabolik sel yang merupakan ciri khas sel viabel. Sel viabel direaksikan dengan *Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, yang mengandung komponen tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium; MTS] dan reagen *electron coupling* (fenazin etosulfat; PES), sebanyak 20 µl akan memproduksi formazan ungu dalam medium setelah diinkubasi 3 jam. Formazan ungu yang terbentuk pada pengujian MTS dapat larut dalam medium kultur yang kemudian serapannya dapat diukur pada panjang gelombang 490 nm sehingga tidak diperlukan penambahan reagen pelarut formazan. PES yang terkandung dalam reagen *Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* berfungsi sebagai *electron coupling* yang dapat meningkatkan stabilitas kimia larutan. Pengukuran jumlah sel pada sampel dapat dilakukan dengan terlebih dahulu membuat kurva standar, sama seperti pengujian dengan MTT.

Kurva standar dibuat dari beberapa konsentrasi suspensi sel punca kanker payudara dimulai dari 75.000 sel per 100 µl kemudian dilakukan dilusi kelipatan dua sampai konsentrasinya 1.172 sel per 100 µl sehingga didapat 7 konsentrasi untuk kurva standar. Jumlah sel yang digunakan pada kurva standar ditentukan berdasarkan hasil optimasi. Setiap konsentrasi diresuspensi dalam medium 100 µl kemudian dipipet ke mikroplat 96 sumur. Suspensi sel dalam plat yang telah diinkubasi semalaman dalam inkubator 37°C untuk pemulihan sel kemudian direaksikan dengan pereaksi MTS selama 3 jam. Kurva standar uji MTS pada pengamatan hari kedua menghasilkan persamaan garis $y = 3,1165 \cdot 10^{-5} x + 0,0388$ dengan nilai $R = 0,9882$, sedangkan pada pengamatan hari keempat menghasilkan persamaan garis $y = 1,066 \cdot 10^{-5} x - 0,0078$ dengan nilai $R = 0,9979$ (Gambar 4.8).



Keterangan : A. Kurva standar MTS assay pada pengamatan ko-kultur hari kedua; B. Kurva standar MTS assay pada pengamatan ko-kultur hari keempat.

Gambar 4.8. Kurva standar uji MTS

Sampel, berupa sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* fibroblas kanker dan normal, dan kontrol, berupa sel punca kanker payudara yang dikultur pada mikroplat tanpa adanya *feeder layer*, masing-masing dipanen dan diresuspensikan dalam 100 μ l medium kemudian dimasukkan ke dalam mikroplat 96 sumur. Suspensi sel punca kanker semua sampel yang dibuat triplo kemudian diuji dengan MTS. Jumlah sel pada sampel dan kontrol dapat diketahui dengan bantuan kurva standar. Pengujian sampel, kontrol, dan kurva standar dilakukan dalam mikroplat 96 sumur yang sama agar semua sampel dalam sumur

mikroplat mendapatkan perlakuan yang sama, baik dalam hal waktu dan suhu inkubasi. Lama inkubasi sampel dengan reagen MTS yang dilakukan penulis adalah selama 3 jam pada suhu 37°C. Blanko pembacaan serapan yang digunakan berupa medium saja (tanpa sel), dengan nilai serapan pada pengukuran hari kedua adalah 0,262 dan pada hari keempat adalah 0,226. Nilai serapan didapatkan dari selisih nilai serapan dari alat pembaca mikroplat dengan serapan blanko (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Hasil pengukuran serapan uji MTS

	Serapan	
	D2	D4
FK	0,344	0,259
	0,344	0,244
	0,246	0,229
FN	0,102	0,014
	0,074	0,037
	0,151	0,094
K	0,067	0,03
	0,052	0,098
	0,043	0,061

Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur, D2 = Pengukuran sampel hari kedua, D4 = Pengukuran sampel hari keempat.

Sel punca kanker payudara awal, sebelum ditanam pada mikroplat dengan atau tanpa *feeder layer*, memiliki rata-rata jumlah sel sebanyak 34.960 sel/sumur. Sel punca kanker payudara awal ini menunjukkan jumlah sel viabel yang lebih tinggi dibandingkan sel punca kontrol maupun sel punca yang diko-kultur (Tabel 4.4). Kondisi ini dapat terjadi mungkin dikarenakan adanya diferensiasi sel punca kanker payudara ataupun adanya lingkungan mikro yang secara selektif menyeleksi sel-sel dengan kemampuan tetap tumbuh menghadapi tantangan dari lingkungan tersebut. Hasil ini sejalan dengan hasil yang didapatkan dari pengujian dengan MTT.

Tabel 4.4. Jumlah sel punca kanker payudara diukur dengan uji MTS

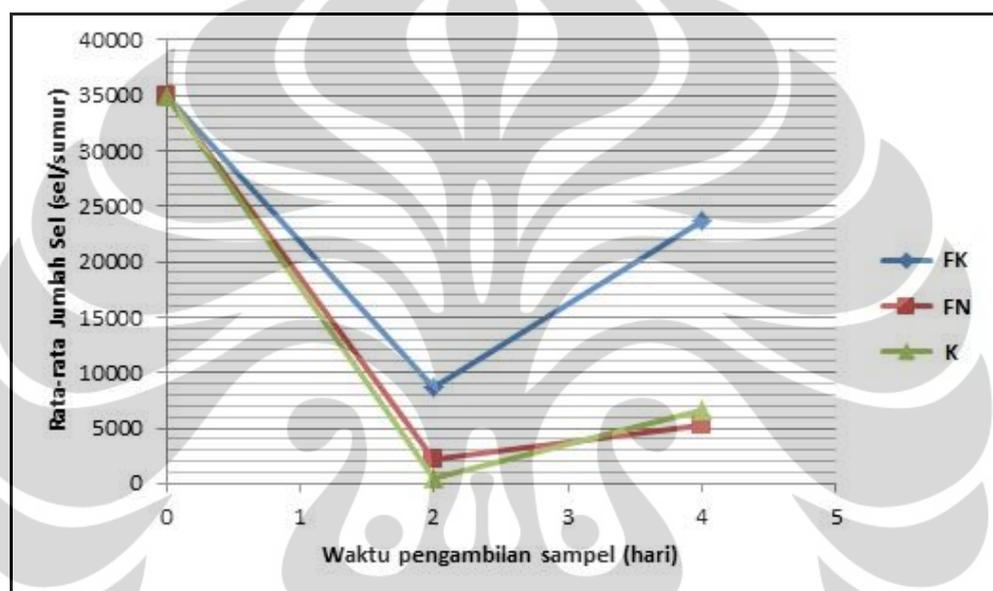
	D2		D4	
	Jumlah (sel/sumur)	Rata-rata (sel/sumur)	Jumlah (sel/sumur)	Rata-rata (sel/sumur)
FK	9.793	8.745	25.028	23.621
	9.793		23.621	
	6.648		22.213	
FN	2.028	2.252	2.045	5.266
	1.129		4.203	
	3.600		9.550	
K	905	488	3.546	6.642
	424		9.925	
	135		6.454	

Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur, D2 = Pengukuran sampel hari kedua, D4 = Pengukuran sampel hari keempat.

Pada pengamatan hari kedua, rata-rata jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker lebih tinggi dari pada rata-rata jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal, dan juga kontrol sel punca kanker. Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09 menunjukkan jumlah rata-rata 8.745 sel/sumur, sedangkan sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 berjumlah 2.252 sel/sumur dan kontrol sebanyak 488 sel/sumur. Perbedaan jumlah ini menunjukkan bahwa proliferasi sel punca kanker payudara lebih tinggi ketika diko-kultur dengan sel fibroblas kanker dibanding sel fibroblas normal. Jumlah rata-rata sel punca kanker pada plat kontrol menunjukkan angka paling rendah dibandingkan jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur karena kondisi ko-kultur memberikan lingkungan yang sesuai bagi pertumbuhan sel punca kanker payudara.

Hasil pengamatan hari keempat memperlihatkan adanya peningkatan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara pada semua perlakuan dibandingkan dengan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara pada pengamatan hari kedua. Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09 pada hari keempat sebanyak 23.621 sel/sumur menunjukkan

peningkatan yang besar dibanding hari kedua. Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 juga menunjukkan peningkatan sehingga jumlah rata-ratanya menjadi 5.266 sel/sumur. Kontrol sel punca kanker payudara mengalami peningkatan jumlah rata-rata sel menjadi 6.642 sel/sumur. Jumlah sel punca kanker pada kontrol yang melebihi jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3 menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan yang berasal dari lingkungannya.



Keterangan: FK = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas kanker CS09, FN = Sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan *feeder layer* sel fibroblas normal (sel *line* BHK21 J3), K = Kontrol sel punca kanker payudara tanpa diko-kultur.

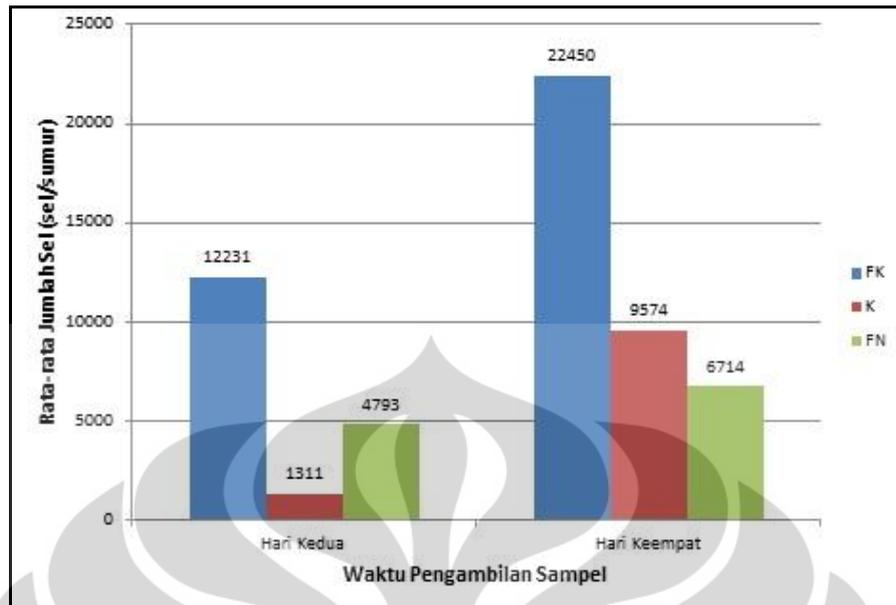
Gambar 4.9. Perkembangan sel punca kanker payudara yang diukur dengan uji MTS

Data pengujian hari kedua dan hari keempat menunjukkan proliferasi sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker lebih tinggi dibandingkan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal (Gambar 4.9). Kontrol sel punca kanker payudara juga memperlihatkan jumlah yang lebih banyak dibanding sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal.

4.5 Pengaruh Lingkungan Mikro terhadap Proliferasi Sel Punca Kanker Payudara

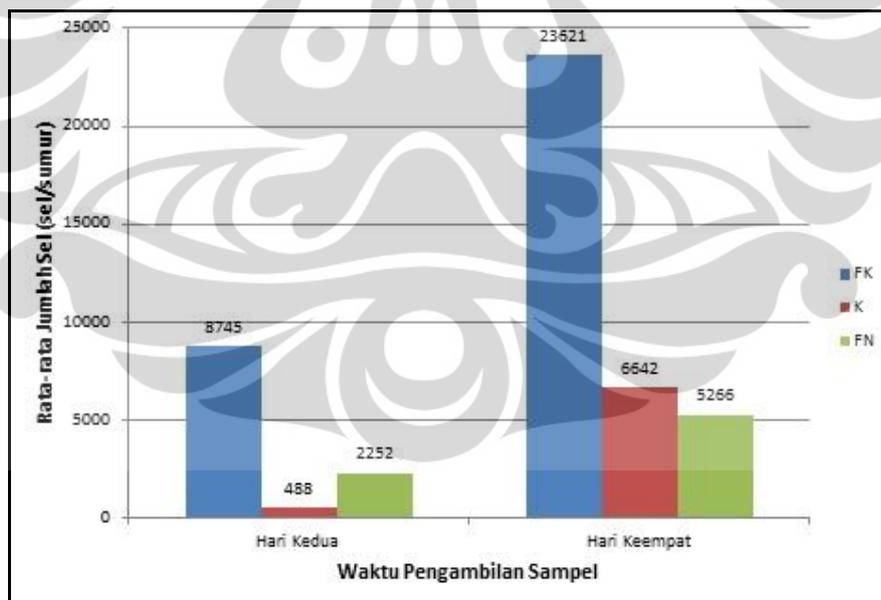
Pengujian proliferasi dengan MTT dan MTS pada sampel dan kontrol menghasilkan jumlah sel punca kanker payudara yang berbeda satu sama lain namun memperlihatkan kesimpulan yang sama. Uji MTT menunjukkan perbedaan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang lebih jelas dibandingkan MTS. Pengukuran proliferasi, baik dengan uji MTT (Gambar 4.10) maupun dengan uji MTS (Gambar 4.11), menunjukkan bahwa jumlah sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker pada pengamatan hari kedua dan hari keempat jauh melebihi jumlah sel punca kanker kontrol dan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal. Persinyalan dari sel fibroblas kanker memfasilitasi perkembangan tumor payudara sehingga keberadaannya sangat penting bagi kelangsungan hidup sel kanker (Kanojia dan Chen, 2011). Sebaliknya sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal mengalami proliferasi yang tidak terlalu signifikan pada hari kedua dan mengalami penghambatan proliferasi pada hari keempat. Hal tersebut dapat dijelaskan dengan melihat jumlah sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal pada hari kedua lebih tinggi dari kontrol, namun pada hari keempat terjadi sebaliknya.

Feeder layer memiliki peranan penting pada sel punca kanker payudara. *Feeder layer* mempengaruhi proliferasi sel dan mempertahankan pluripotensi sel dengan cara menyediakan permukaan yang sesuai tempat melekat sel (Reubinoff, Pera, Fong, Trounson, dan Bongso, 2000; Thomson et al., 1998). *Feeder layer* sel fibroblas BHK 21 J3 memberikan lingkungan yang lebih kondusif bagi proliferasi dibanding kontrol yang tidak memiliki *feeder layer*. Penahanan proliferasi dari sel fibroblas BHK 21 J3 baru dapat terlihat pada pengamatan hari keempat. Penghambatan proliferasi terjadi dapat dikarenakan adanya sinyal inhibisi dari lingkungan mikronya yang tidak bersifat kanker.



Keterangan : FK = Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09, K = Jumlah rata-rata kontrol sel punca kanker payudara yang tidak diko-kultur, FN = Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3.

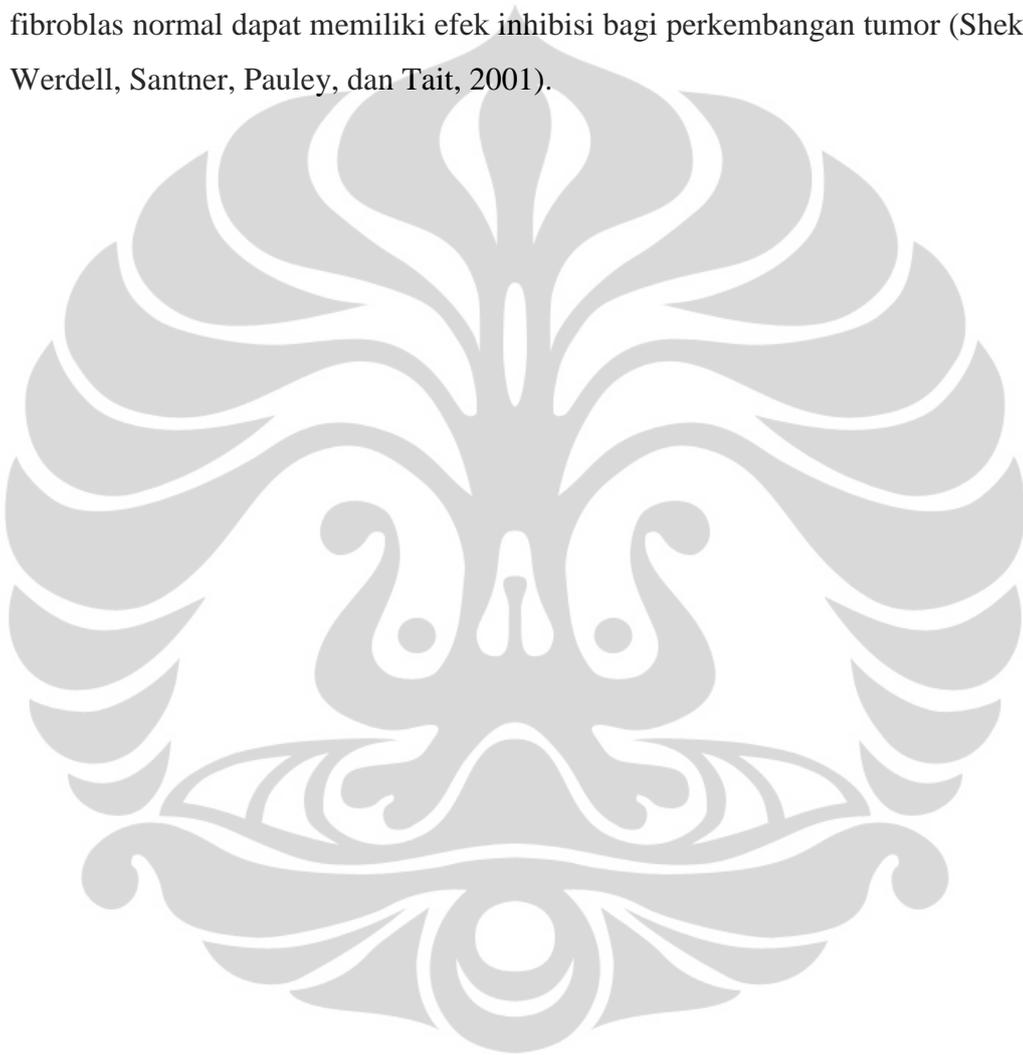
Gambar 4.10. Perbandingan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara dengan uji MTT



Keterangan : FK = Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker CS09, K = Jumlah rata-rata kontrol sel punca kanker payudara yang tidak diko-kultur, FN = Jumlah rata-rata sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas BHK 21 J3.

Gambar 4.11. Perbandingan jumlah rata-rata sel punca kanker payudara dengan uji MTS

Pengujian proliferasi sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan berbagai kondisi memperlihatkan bahwa sel punca kanker payudara dapat mempertahankan keganasan dan sifat *self-renewal* apabila berada dalam lingkungan mikro yang abnormal. Hasil pengujian ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa sel fibroblas kanker mampu meningkatkan jumlah sel CD44⁺/CD24⁻ pada *mammosphere* (Huang, Li, dan Nan, 2010) dan sel fibroblas normal dapat memiliki efek inhibisi bagi perkembangan tumor (Shekhar, Werdell, Santner, Pauley, dan Tait, 2001).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Pengukuran proliferasi dengan menggunakan uji MTT menunjukkan bahwa sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker memiliki jumlah sel viabel tertinggi.
2. Pengukuran proliferasi dengan menggunakan uji MTS menunjukkan bahwa sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker memiliki jumlah sel viabel tertinggi.
3. Lingkungan mikro sel fibroblas mempengaruhi proliferasi sel punca kanker payudara.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisis proliferasi lebih lanjut terhadap sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal yang berasal dari jaringan normal payudara manusia.
2. Perlu dilakukan analisis proliferasi sel punca kanker payudara dengan menggunakan uji BrdU yang menggunakan sintesis DNA sebagai indikator pertumbuhan sel.
3. Kandungan serum pada medium DMEM *high glucose* yang digunakan untuk meresuspensi sel pada pengujian MTT atau MTS sebaiknya dikurangkan atau dihilangkan karena mengakibatkan pertumbuhan berlebihan saat pemulihan sel selama semalam di inkubator 37°C.
4. Mikroplat yang digunakan untuk melakukan ko-kultur sebaiknya dengan mikroplat 12 sumur sehingga waktu pengamatan dapat diperpanjang dan pengaruh lingkungan mikro semakin terlihat.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. (2010, 10 Juni). *Senam dan Makanan Sehat Cegah Kanker Sejak Dini*. 15 Januari, 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/132-enam-dan-makanan-sehat-cegah-kanker-sejak-dini.html>.
- Al Hajj, M., Wicha M.S., Hernandez A.B., Morrison S.J., dan Clarke M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983–3988.
- American Cancer Society. (2011). *Cancer Facts and Figure 2007*. Atlanta: American Cancer Society.
- Baguley, B.C. (2006). Tumor Stem Cell Niches : a new functional framework for the action of anticancer drugs. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.*, 1, 121-127.
- Bapat, S.A. (2009). *Cancer Stem Cells: Identification and Target*. New York: John Wiley and sons.
- Basse, B., et al. (2003). A mathematical model for analysis of the cell cycle in cell lines derived from human tumors. *J. Math. Biol.*, 47, 4, 295-312.
- Bertolotti, R., & Ozawa, K. (Ed.). (2008). *Autologous and Cancer Stem Cell Gene Therapy*. Vol. 3. Singapore: World Scientific Publishing.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., & Moses, H.L. (2004, November 18). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432, 7015, 332-337.
- Bishop, G.M., & Weinberg, R.A. (1996). *Molecular Oncology*. New York : Scientific American.
- Bissell, M.J., & LaBarge, M.A. (2005). Context, Tissue Plasticity, and Cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?. *Cancer Cell*, 7, 1, 17-23.
- Bissell, M.J., Radisky, D.C., Rizki, A., Weaver, V.M., & Petersen, O.W. (2002). The Organizing Principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation*, 70, 537-546.
- Chiang, A.C, & Massague, J. (2008). Molecular basis of metastasis. *N. Eng. J. Med.*, 359, 26, 2814-2823.
- Clarke, M.F. (2005). A Self-renewal Assay for Cancer Stem Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56, s64-s68.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358, 502-511.
- Dean, M., Fojo, T., & Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 4, 275-284.

- DeCosse, J.J., Gossens, C.L., Kuzma, J.F., & Unsworth, B.R. (1973). Breast cancer : induction of differentiation by embryonic tissue. *Science*, 181, 1057-1058.
- Dontu, G., et al. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem / progenitor cells. *Genes Dev.*, 17, 1253-1270.
- Dontu, G., Jackson, K.W., McNicholas, E., Kawamura, M.J., Abdallah, W.M., & Wicha, M.S. (2004). Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.*, 6, R605-R615
- Eisel, D., Fertig, G., Fischer, B., Manzow, S., & Schmelig, K. (Ed.). (1998). *Apoptosis and Cell Proliferation*. Vol. 2. Jerman: Boehringer Mannheim.
- Freshney, I.R. (2005). *Culture of Animal Cells : a manual of basic technique*. USA : John Wiley and Sons.
- Gunduz, M., & Gunduz, E. (Ed.). (2011). *Breast Cancer – Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis*. Croatia : InTech.
- Haque, M.A., Nagaoka, M., Hexig, B., & Akaike, T. (2010). Artificial Extracellular Matrix for Embryonic Stem Cell Cultures : a new frontier of nanobiomaterials. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 11, 014106.
- Hill, R.P., & Perris, R. (2007). “Destemming” cancer stem cells. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 99, 1435-1440.
- Honeth, G., et al. (2008). The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.*, 10, R53.
- Huang, K.T., Chen Y.H., & Walker A.M. (2004). Inaccuracy in MTS assays : major disorting effects of medium, serum albumin, and fatty acid. *BioTechniques*, 37, 406-412.
- Huang, M., Li, Y., Zhang, H., dan Nan, F. (2010). Breast cancer stromal fibroblast promote the generation of CD44⁺/CD24⁻ cells through SDF-1/CXCR4 interaction. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 29, 80.
- Jessen, L.R., & Bissell, M.J. (2009). Breast Cancer Proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence? *Trends Mol. Med.*, 15,1, 5-13.
- Jordan, C.T., Guzman, M.L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cell. *N. Engl. J. Med.*, 355, 1253-1261.
- Kresno, S.B. (2011). *Ilmu Dasar Onkologi*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Langdon, S.P. (Ed.). (2004). *Cancer Cell Culture : methods and protocols*. Totowa: Humana Press.
- Lochter, A., & Bissell, M.J. (1995). Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 6, 3, 165-173.
- Majumder, S. (Ed.). (2009). *Stem Cells and Cancer*. New York: Springer Science.

- Mecham, R.P. (Ed.). (2011). *The Extracellular Matrix: an overview*. Berlin : Springer.
- Merck Online Manual of Diagnosis and Therapy. (2008). *Breast Disorders: Cancer*. US: Merck.
- Mikkelsen, T.S., et al. (2008, Juli 3). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 49-55.
- Neville, M.C., Medina, D., Monks, J., & Hovey, R.C. (1998). The mammary fat pad. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3, 109-116.
- Pinne, S.R., Ryan, B.M., Varticovski, L., Robles, A.I., & Harris, C.C. (2010). Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cell. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 107, 5, 2195-2200.
- Ponti, D., et al. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic cells with stem/progenitor cells properties. *Cancer Res.*, 65, 13, 5506-5511.
- Reubinoff, B.E., Pera, F.P., Fong, C.Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.*, 18, 399-404.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., & Weisman, I.L. (2001, November 1). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 105-111
- Reya, T., & Clevers, H. (2005, April 14). Wnt signaling in stem cells and cancer. *Nature*, 843-850.
- Shekhar, M.P., Werdell, J., Santner, S.J., Pauley, R.J., dan Tait, L. (2001). Breast stroma plays a dominant regulatory role in breast epithelial growth and differentiation : implications for tumor development and progression. *Cancer Res.*, 61, 1320-1326.
- Sheridan, C., et al. (2006). CD44⁺/CD24⁻ Breast Cancer Stem Cells Exhibit Enhanced Invasive Properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.*, 8, R59.
- Sujata, L., & Chaudhuri, S. (2008). Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. *Cell Mol. Immunol.* 5, 2, 107-112.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126, 663-676.
- Takahashi, K. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 5, 861-872.
- Takashi, M., et al. (2009). Breast cancer expressing stem cell markers CD44⁺CD24^{lo} are eliminated by Numb-1 peptide-activated T cells. *Cancer Immunol. Immunother.*, 58(8), 1185-1194.
- Tang, C., Beng, T.A., dan Shazib, P. (2007). Cancer Stem Cell: Target for Anti-Cancer Therapy. *Faseb J.*, 21, 3777-3778.

- Thomson, J.A., et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147.
- Tiara, L. (2011). *Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara Manusia dengan Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) untuk Mempertahankan Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Till, J.E. & Mc, C.E.A. (1874). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 14, 213-222.
- Turkington, C., & Krag, K. (2005). *The Encyclopedia of Breast Cancer*. New York : Facts On File.
- Watt, F.M., & Hogan, B.L. (2000). Out of Eden : stem cells and their niches. *Science*, 287, 5457, 1427-1430.
- Welte, Y., Adjaye, J., Lehrach, H.R., & Regenbrecht, C.R.A. (2010). Cancer Stem Cells in Solid Tumors: elusive or illusive? *J. Cell Commun. Signal.*, 8, 6.
- Wicha, S.W. (2008). Cancer stem cell heterogeneity in hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 10, 105.
- Wiseman, B.S., & Werb, Z. (2002). Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. *Science*, 296, 5570, 1046-1049.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C. D., Carlson M.D., Ambudkar, S.V., & Varticovski, L. (2008). BRCA1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.*, 10, R10.
- Zent, R., & Pozzi, A. (Ed.). (2010). *Cell-Extracellular Matrix Interactions in Cancer*. New York : Springer Science.

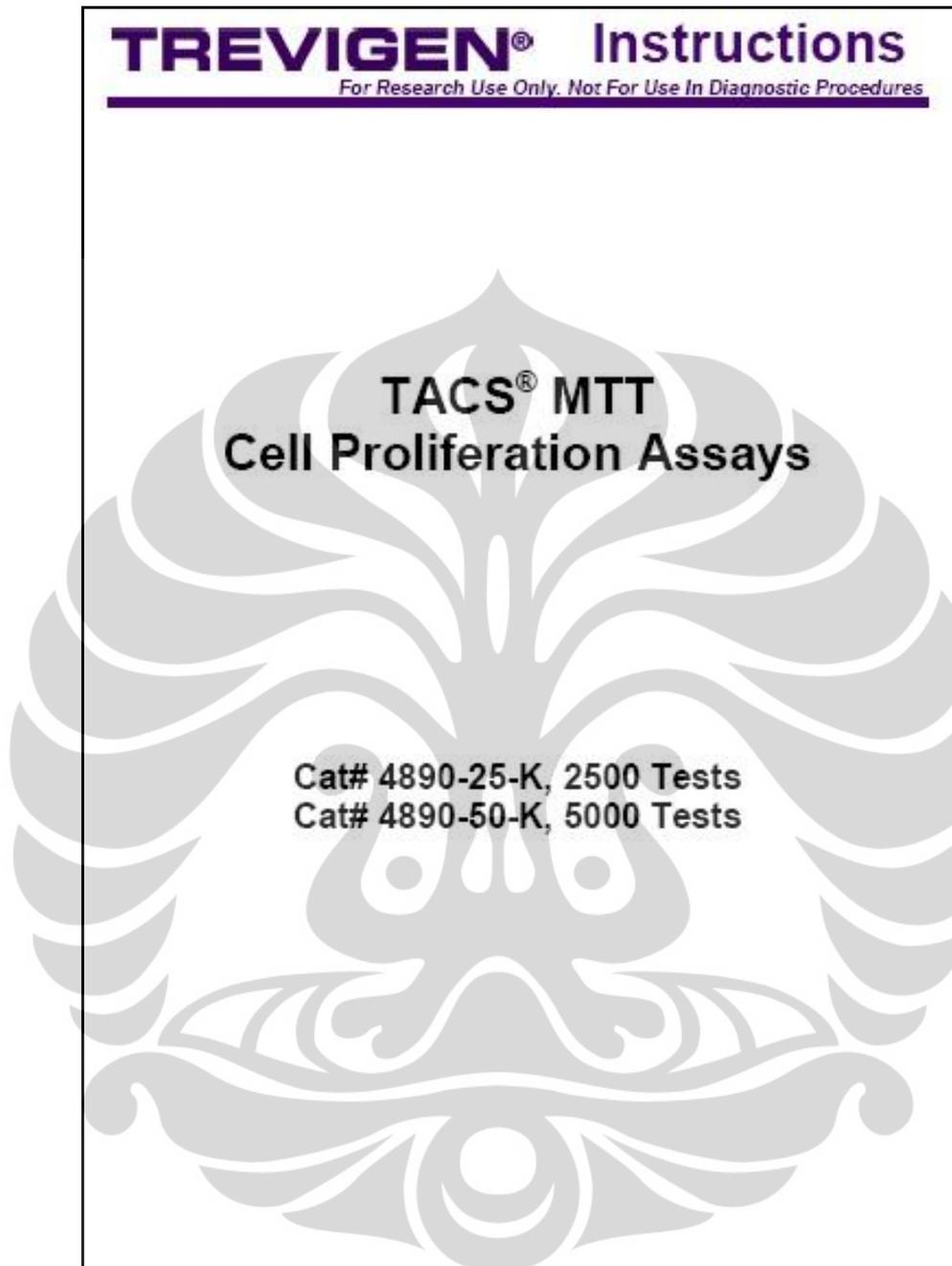


LAMPIRAN

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

Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
Asam amino	
Glisin	30
L-Arginin hidroklorida	84
L-Sistein. 2HCl	63
L-Glutamin	584
L-Histidin	42
L-Isoleusin	105
L-Leusin	105
L-Lisin hidroklorida	146
L-Metionin	30
L-Fenilalanin	66
L-Serin	42
L-Treonin	95
L-Triptofan	16
L-Tirosin	104
L-Valine	94
Vitamin	
Kolin Klorida	4
D-kalsium pantotenat	4
Asam folat	4
Niasinamid	4
Piridoksin hidroklorida	4
Riboflavin	0,4
Tiamin hidroklorida	4
i-Inositol	7,2
Garam inorganik	
Feri nitrat	0,1
Magnesium sulfat anhidrat	97,67
Kalium klorida	400
Natrium klorida	6400
Natrium fosfat	125
Komponen lain	
D-glukosa	4500
Fenol merah	15
Natrium piruvat	110

Lampiran 2. Komposisi *TACS[®] MTT Cell Proliferation Assay*



(lanjutan)

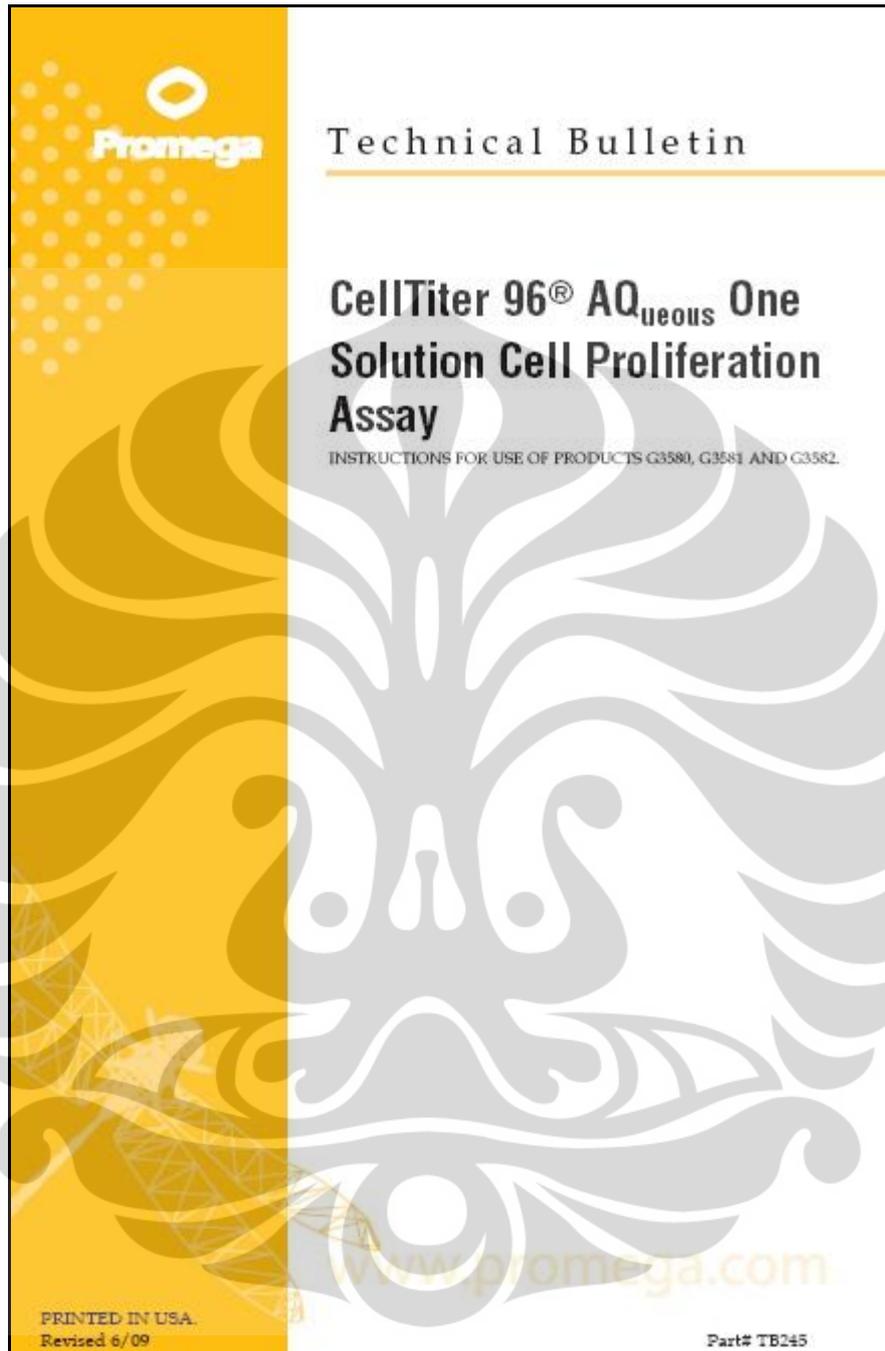
II. Precautions and Limitations

1. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
2. The physical, chemical and toxicological properties of the provided products may not yet have been fully investigated; therefore, Trevigen recommends the use of gloves, lab coats, and eye protection while using these chemical reagents. Trevigen assumes no liability for damage resulting from handling or contact with these products.
3. MTT Reagent (Cat# 4890-25-01) contains less than 1% (w/v) MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (CAS # 298-93-1). MTT is toxic and may cause heritable genetic defects. In case of contact, immediately flush eyes or skin with copious amounts of water. If swallowed, wash out mouth with water provided person is conscious. Call a physician.
4. Detergent Solution (Cat# 4890-25-02) contains SDS which is an irritant. In case of contact, immediately flush eyes or skin with copious amounts of water. If swallowed, wash out mouth with water provided person is conscious.

III. Materials Supplied

Cat# 4890-25-K Component	Quantity	Storage	Catalog #
MTT Reagent	25 ml	4 °C	4890-25-01
Detergent Reagent	250 ml	room temp	4890-25-02

Lampiran 3. Komposisi *CellTiter 96[®] AQueous One Solution*



(lanjutan)

2. Product Components and Storage Conditions		
Product	Size	Cat.#
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	200 assays	G3582
For Laboratory Use. Includes:		
<ul style="list-style-type: none"> 4ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 		
Product	Size	Cat.#
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	1,000 assays	G3580
For Laboratory Use. Includes:		
<ul style="list-style-type: none"> 20ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 		
Product	Size	Cat.#
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	5,000 assays	G3581
For Laboratory Use. Includes:		
<ul style="list-style-type: none"> 100ml CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent 		
<p>Storage Conditions: For long-term storage, store the CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent at -20°C, protected from light. See the expiration date on the Product Information Label. For frequent use, solutions may be stored at 4°C, protected from light, for up to 6 weeks.</p>		
<p>Note: The performance of CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent after 10 freeze-thaw cycles was demonstrated to be equal to that of freshly prepared solution.</p>		
<p>Safety: To the best of our knowledge, the chemical, physical and toxicological properties of this product have not been thoroughly investigated; therefore, we recommend the use of gloves, lab coats and eye protection when working with these or any chemicals.</p>		
<p>Light-Sensitivity: The CellTiter 96[®] AQueous One Solution Reagent is light-sensitive and is supplied in an amber container. Discoloration may occur if solutions are exposed to light outside of the container for several hours. This discoloration may cause slightly higher background 490nm absorbance readings, but it should not affect the performance of the CellTiter 96[®] AQueous One Solution Assay.</p>		

Lampiran 4. Perhitungan kurva standar

Pengujian MTT

Jumlah sel	Pengamatan Hari Kedua			Pengamatan Hari Keempat		
	Serapan (A)	Blanko (B)	A-B	Serapan (A)	Blanko (B)	A-B
75.000	1,459	0,080	1,379	0,859	0,094	0,765
37.500	0,786		0,786	0,452		0,358
18.750	0,441		0,441	0,261		0,167
9.375	0,221		0,221	0,186		0,092
4.687,5	0,097		0,097	0,134		0,04
2.343,75	0,042		0,042	0,118		0,024
1.171,875	0,024		0,024	0,123		0,029

Pengujian MTS

Jumlah sel	Pengamatan Hari Kedua			Pengamatan Hari Keempat		
	Serapan (A)	Blanko (B)	A-B	Serapan (A)	Blanko (B)	A-B
75.000	2,500	0,262	2,238	1,035	0,226	0,809
37.500	1,724		1,462	0,596		0,370
18.750	0,963		0,701	0,391		0,165
9.375	0,577		0,315	0,314		0,088
4.687,5	0,389		0,127	0,275		0,049
2.343,75	0,310		0,048	0,251		0,025
1.171,875	0,281		0,019	0,252		0,026

Lampiran 5. Gambar alat yang digunakan dalam penelitian



Keterangan :

- A. *Biosafety Cabinet Class II* [Esco, China]
- B. *CO₂ Inkubator IL-60160-1491* [Barnstead, USA]
- C. *Microplate reader model 680* [Biorad, USA]
- D. *Mikroskop inverted* [Olympus, USA]
- E. *Mikrosentrifus* [Sorvell Biofuge Primo, USA]

Lampiran 6. Surat persetujuan komisi etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Salemba Raya No. 6 Jakarta Pusat
Pos Box 1358 Jakarta 10430
Kampus Salemba Telp. 31930371, 31930373, 3922977, 3927360, 3912477, 3153236, Fax. : 31930372, 3157288, e-mail : office@fk.ui.ac.id

NOMOR : 196 /PT02.FK/ETIK/2009

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL — CLEARANCE

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

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

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

Nama Institusi : Biokimia dan Biologi Molekular FKUI

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

Jakarta, 25 Mei 2009



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

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

(lanjutan)



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 : 33 /PT02.FK/ETIK/2011

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK

ETHICAL CLEARANCE

Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul:

The Ethics Committee 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 research protocol entitled:

“Peran Sel Fibroblast Stroma pada Pluripotensi dan Ketahanan Hidup Sel Punca Kanker Payudara”.

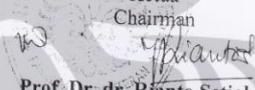
Peneliti Utama : **Aroem Naroeni, DEA, PhD**
Principal Investigator

Nama Institusi : **Institute of Human Virology and Cancer Biology of**
Name of the Institution **the University of Indonesia (IHVCB-UI)**

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

Jakarta, 18 JULI 2011...

Ketua
Chairman



Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan
**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*