



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP PLURIPOTENSI SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

**RUDY
0806328045**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP PLURIPOTENSI SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

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

**RUDY
0806328045**

**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, 17 Juli 2012



Rudy

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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



Nama : Rudy
NPM : 0806328045
Tanda tangan : 
Tanggal : 17 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rudy
NPM : 0806328045
Program Studi : S1 Reguler
Judul Skripsi : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara


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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, M.Si

()

Pembimbing II : Aroem Naroeni, DEA., Ph.D

()

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

()

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

()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas segala berkat dan karuniaNya, saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada 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 menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing I, yang telah memberikan waktu, tenaga, pikiran, 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 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. Dra. Maryati Kurniadi M.Si., Apt. selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan pikiran yang sangat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA-UI.
4. Prof. Effionora Anwar, Prof. Yahdiana Harahap, Dr. Berna Elya, Dr. Abdul Munim, dan Dr. Joshita Djajadisastra yang selalu memberikan waktu, nasihat, dan motivasi yang sangat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA-UI.

5. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, yang telah memberikan kesempatan sehingga penulis dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA-UI.
6. Pembina, Ketua Pengurus serta anggota, staf karyawan Laboratorium *Institut of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), khususnya dr. Fera Ibrahim, M.Sc, Ph.D, SpMK selaku *Director for Science* dan dr. Budiman Bela selaku *Vice Director for Science* IHVCB-UI, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di IHVCB-UI.
7. Kedua orang tua (Ayahanda Hartono dan Ibunda Sarinah), ketiga kakak (Kakak pertama Erni, Kakak kedua Joni, dan Kakak ketiga Erna) yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang dan semangat kepada saya selama ini.
8. Sahabat-sahabat saya (Merrie, Fungi, Stepfina, Evennia, Jenifer, Patricia, dan Rafael) yang telah berjuang bersama saya selama perkuliahan; Michelle, Tris, Nurul, dan Winnie sebagai teman-teman seperjuangan dalam penelitian; drh.Sofy, Ibu Silvi, Ibu Heni, Ibu Ratna, Bapak Catur, Kak Yuli, Kak Wuri, Kak Nada, Kak Eka, Kak Irwan, Kak Rio, Kak Maman, dan Kak Azmier yang telah membagikan pengetahuan ilmu biomedik yang sangat berharga dalam masa penelitian saya di IHVCB-UI; dr. Aida yang selalu memberi semangat; Mochtar dan Rizal yang menjadi sahabat kontrakan yang baik dan selalu menyemangati; Putri, Monica, dan Claudia yang selalu mendoakan dan menyemangati; dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu-persatu yang telah memberikan bantuan hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

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

Penulis

2012

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

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

Nama : Rudy
NPM : 0806328045
Fakultas : Farmasi
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis.

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Pada tanggal: 17 Juli 2012

Yang menyatakan



Rudy

ABSTRAK

Nama : Rudy
Program Studi : Farmasi
Judul : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Pluripotensi Sel Punca Kanker Payudara

Pemahaman karakteristik sel punca kanker merupakan salah satu cara untuk menemukan terapi yang tepat untuk mengobati penyakit kanker. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan pengaruh lingkungan mikro yang dihasilkan oleh sel fibroblas normal dan kanker terhadap pluripotensi sel punca kanker payudara. Sel fibroblas dan sel punca kanker payudara masing-masing dikultur dengan menggunakan medium kultur DMEM *high glucose*. Kemudian sel punca kanker diko-kultur dengan sel fibroblas, baik sel fibroblas normal maupun kanker. Pengukuran pluripotensi dilakukan dengan 2 cara, yaitu pengukuran ekspresi penanda permukaan CD44⁺/CD24⁺ dengan spektrofotometer dan pengukuran ekspresi SOX2 dengan menggunakan *reverse transcription-polymerase chain reaction*. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa pluripotensi sel punca kanker payudara menurun pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas, baik fibroblas normal maupun kanker, namun, ekspresi penanda permukaan dan SOX2 pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker lebih tinggi dibandingkan dengan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal. Dari hasil ini, kami menyimpulkan bahwa lingkungan mikro yang dihasilkan sel fibroblas normal dan kanker mampu menurunkan tingkat pluripotensi sel punca kanker payudara sehingga lingkungan mikro dapat dimanfaatkan sebagai sarana untuk menghilangkan sel punca kanker.

Kata Kunci : lingkungan mikro, penanda permukaan, pluripotensi, sel punca kanker, SOX2
xv+67 halaman : 19 gambar; 4 tabel; 9 lampiran
Daftar Pustaka : 43 (1989–2012)

ABSTRACT

Name : Rudy
Study Program : Pharmacy
Title : The Effect of Normal and Cancer Fibroblast Cells
Microenvironment toward The Pluripotent Characteristics of
Breast Cancer Stem Cells

Understanding and figuring out the characteristics of cancer stem cells is believed as a way to find a perfect therapy in treating cancer disease. This research aims to find out the effect of the microenvironment provided by either normal fibroblast cells or cancer fibroblast cells toward the pluripotent characteristics of breast cancer stem cells. Both the fibroblast cells and the cancer stem cells were cultured independently using DMEM high glucose. The cancer stem cells were then co-cultured into the fibroblast cells, both normal and cancer cells. The pluripotent characteristics were measured using two methods; expression of CD44⁺/CD24⁺ cell surface markers using fluorescent spectroscopy and expression of SOX2 using reverse transcription - polymerase chain reaction. Results showed that the expression of both CD44⁺/CD24⁺ cell surface markers and SOX2 decreased in breast cancer stem cells co-cultured with the fibroblast cells, whereas the expression in the cancer stem cells co-cultured with cancer fibroblast cells were higher than those co-cultured with the normal fibroblast cells. From the results, we suggest that the microenvironment created by either normal fibroblast cells or cancer fibroblast cells could decrease the pluripotent characteristics of breast cancer stem cells, hence microenvironment can be used as a tool to eradicate cancer stem cells.

Key Words : cancer stem cells, microenvironment, pluripotent, SOX2, cell surface markers

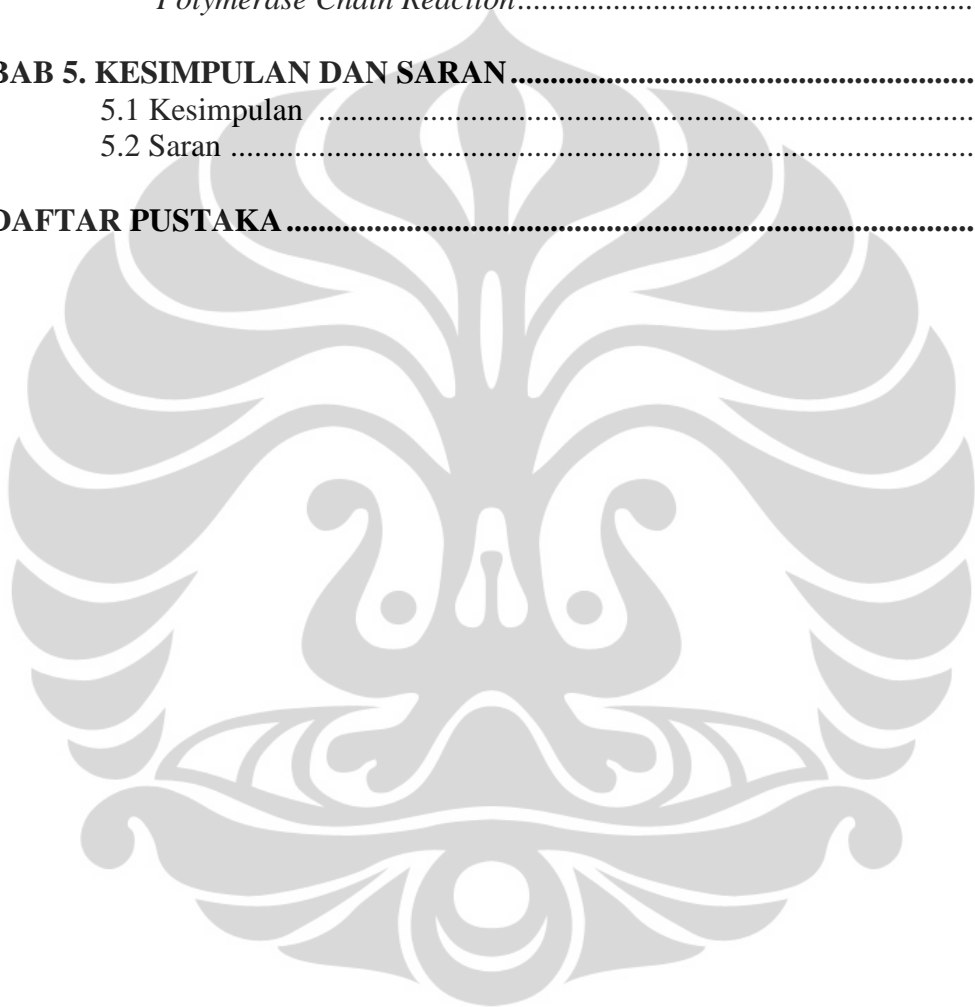
xv+67 pages : 19 pictures; 4 tables; 9 appendices

Bibliography : 43 (1989–2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kanker Payudata	4
2.2 Sel Punca Kanker.....	6
2.3 Gen SOX2.....	8
2.4 Sel Fibroblas	9
2.5 Isolasi RNA.....	10
2.6 Normalisasi mRNA.....	11
2.7 Identifikasi Sel Punca Kanker.....	13
2.8. Analisis Ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ secara Spektrofluorometri	14
2.9. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)</i>	14
2.10. <i>Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	17
2.11. Elektroforesis Gel Agarose.....	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	22
3.2 Alat.....	22
3.3 Bahan	22
3.4 Cara Kerja	23
3.4.1 Persiapan Media Kultur DMEM tinggi glukosa.....	24
3.4.2 Kultur Sel.....	24
3.4.3 Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara dengan Sel CS09K dan Sel BHK 21 J3.....	26
3.4.4 Analisis Ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ secara Spektrofluorometri	26
3.4.5 Ekstraksi Total RNA	27
3.4.6 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop.....	29
3.4.7 Analisis SOX2 secara Semi-kuantitatif dengan Menggunakan <i>Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> dan Elektroforesis Gel Agarose	29

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Pembuatan Medium Kultur	31
4.2 Kultur Sel CS09K	32
4.3 Kultur Sel Fibroblas Normal BHK (<i>Baby Hamster Kidney</i>).....	34
4.4 Kultur Sel Punca Kanker	35
4.5 Ko-kultur Sel Punca Kanker dalam sel CS09K dan sel BHK 21 J3...36	36
4.6 Analisis Ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ secara Spektrofluorometri	39
4.7 Ekstraksi Total RNA dan Analisis Kemurnian Total RNA.....	44
4.8 Analisis Ekspresi Gen SOX2 Menggunakan <i>Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction</i>	46
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Anatomi Payudara Normal Manusia	4
Gambar 2.2.	Hipotesis Sel Punca Kanker	7
Gambar 2.3.	Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia	9
Gambar 2.4.	Letak Gen PUM1 pada Kromosom Manusia	13
Gambar 2.5.	Kurva Proses PCR	15
Gambar 2.6.	Proses RT-PCR	16
Gambar 2.7.	Skema Kerja dari <i>SBRY® Green I</i>	17
Gambar 2.8.	Suatu Plot Amplifikasi pada <i>Real-Time PCR</i>	18
Gambar 3.1.	Skema Alur Kerja Penelitian	24
Gambar 3.2.	Skema Alur Kerja Analisis Ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺	27
Gambar 3.3.	Skema Alur Kerja Ekstraksi Total RNA	28
Gambar 4.1.	Pertumbuhan sel CS09 kanker payudara	33
Gambar 4.2.	Pertumbuhan sel BHK 21 J3	35
Gambar 4.3.	Pertumbuhan sel punca kanker	36
Gambar 4.4	Ko-kultur sel punca kanker dengan sel fibroblas normal dan kanker	38
Gambar 4.5.	Diagram hasil pengukuran ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ hari ke-2	42
Gambar 4.6.	Diagram hasil pengukuran ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ hari ke-4	43
Gambar 4.7.	Diagram perbandingan hasil pengukuran ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺ hari ke-2 dan hari ke-4 pada kokultur	44
Gambar 4.8.	Hasil elektroforesis ekspresi gen SOX2	47

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hasil pengukuran ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺	40
Tabel 4.2.	Hasil pengolahan data ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺	41
Tabel 4.3.	Hasil pengukuran konsentrasi RNA.....	46
Tabel 4.4.	Densitas hasil elektroforesis ekspresi gen SOX2.....	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>).....	54
Lampiran 2.	Surat persetujuan komisi etik	56
Lampiran 3.	Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian	58
Lampiran 4.	Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses <i>reverse transcription</i> PCR.....	61
Lampiran 5.	Posisi dan urutan basa primer SOX2 dan PUM1	62
Lampiran 6.	Spesifikasi primer SOX2 dan PUM1	63
Lampiran 7.	Sertifikat analisis <i>RNeasy Mini Kit</i>	64
Lampiran 8.	Sertifikat analisis <i>Qiagen OneStep RT-PCR</i>	65
Lampiran 9.	Gambar alat yang digunakan dalam penelitian.....	66



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan penyakit yang memiliki prevalensi yang tinggi di Indonesia dan dilaporkan menduduki peringkat kedua pada kasus kanker pada perempuan (Depkes RI, 2007, h.52). Menurut WHO sebesar 8–9% wanita mengalami jenis kanker tersebut dan hanya 50% pasien kanker payudara stadium akhir yang mampu bertahan hidup selama 18–30 bulan (Aditama, 2010). Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007, angka kejadian kanker payudara di Indonesia sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2010). Penelitian-penelitian sebelumnya menemukan bahwa terjadinya penyebaran kanker dan pembentukan kanker baru disebabkan oleh sebagian kecil sel kanker yang dikenal sebagai sel punca kanker.

Sampai pada saat ini, telah ada banyak penelitian yang dilakukan dalam rangka mengetahui peranan sel punca dalam tubuh manusia dan kegunaannya dalam dunia kedokteran dan pengobatan. *Stem cell* atau sel punca adalah sel tunggal yang dapat bereplikasi untuk memperbanyak diri atau berdiferensiasi menjadi jenis sel lain. Pada banyak jaringan, sel ini berperan sebagai sistem perbaikan internal yaitu dengan membelah dan menggantikan sel yang telah rusak atau mati selama organisme tersebut masih hidup (Siminovith, McCulloch, & Till, 1963). Sifat regeneratif yang dimiliki oleh sel punca ini sangat penting terutama pada jaringan yang aktif membelah seperti sel sumsum tulang belakang.

Sel punca kanker atau *cancer stem cell* (CSC) adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor. Karakter *self renewal* yang dimiliki oleh sel punca kanker berbeda pada sel punca normal dimana sel punca normal akan berhenti membelah jika jumlah sel yang diinginkan sudah tercapai, sedangkan pada sel punca kanker, sistem ini mengalami disregulasi dalam menginhibisi pembelahannya sehingga jumlah sel dalam jaringan kanker akan meningkat. Oleh

karena itu, sel punca kanker disebut memiliki *indefinite proliferative potential* atau potensi proliferasi yang tak terbatas (Mei Zhang dan Rosen, 2006). Adanya sifat *self renewal* ini diduga memiliki peranan dalam resistensinya terhadap obat, yaitu ketahanan sel dalam menghadapi xenobiotik. Salah satu agen yang terlibat dalam mekanisme menangkal xenobiotik ini adalah *ATP-binding cassette transporter* yang terekspresi dalam level tinggi dalam sel punca kanker pada kanker payudara (Zhou et al., 2001). Oleh karena itu, diduga sel punca kanker juga memiliki andil dalam kegagalan kemoterapi.

Keberadaan sel punca kanker payudara manusia yang heterogen telah dibuktikan berdasarkan identifikasi beberapa penanda permukaan sel, yaitu $CD44^+$, $CD24^-$, ESA^+ dan $CD133^+$ pada populasi sel punca kanker payudara yang berbeda (Fillmore dan Kuperwasser, 2007). Setiap kanker memiliki potensi keganasan yang berbeda-beda, sehingga diperlukan perlakuan yang berbeda untuk setiap jenis kanker. Identifikasi sel kanker mampu memperlihatkan potensi keganasan sel kanker tersebut sehingga dapat dipilih terapi yang sesuai.

Penelitian – penelitian sebelumnya terkait sel punca kanker payudara sudah mengukur tingkat ekspresi gen SOX2 yang ditanam pada suatu medium terkondisi dari kultur feeder layer *Mouse Embryonic Fibroblast* (MEF) pada peranannya dalam menentukan pluripotensi dan pertumbuhan sel (Liza Tiara, 2011) dengan didahului oleh pengukuran level RNA gen penanda sel punca kanker payudara dari kultur sel primernya (Aulia Ornella, 2010). Pada penelitian kali ini, akan dilihat ekspresi gen SOX2 untuk melihat pluripotensi sel kanker secara spektrofotometri dengan menggunakan antibodi rabbit anti $CD44^+$ dan mause anti $CD24^-$. Pengukuran level ekspresi gen SOX2 secara semi-kuantitatif dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kepluripotensian sel punca kanker payudara dalam pengaruh lingkungan sel fibroblas yang normal dan kanker dengan cara mengukur tingkat ekspresinya menggunakan spektrofotometri dan *reverse-transcription* PCR.

1.3 Manfaat Penelitian

Mengetahui karakter sel punca kanker payudara yang berasal dari pasien wanita Indonesia yang diperoleh dari penelitian ini untuk dapat mengoptimasi pengobatan kanker payudara wanita Indonesia.

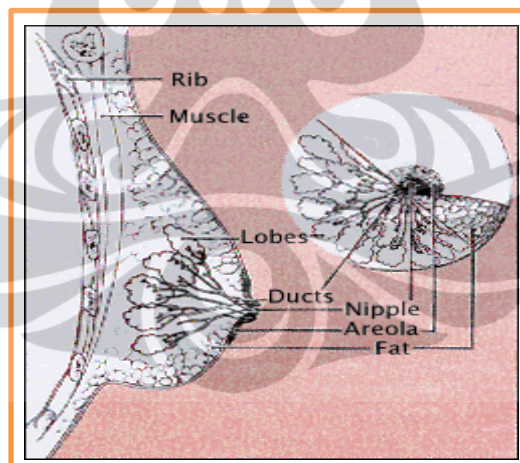


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker Payudara

Payudara terdiri dari kelenjar penghasil susu yang disebut lobulus, dikelilingi oleh lapisan lemak dan tidak berisi jaringan otot. Payudara didukung dan melekat pada dinding dada oleh ligamen yang disebut *Cooper's ligament*. Jaringan payudara melekat pada otot dada yang disebut *pectoralis mayor*. Setiap payudara berisi 15-20 lobus yang diselubungi dan didukung oleh jaringan ikat atau lemak. Setiap lobus mengandung lobulus yang berfungsi sebagai kantung penghasil susu. Hasil produksi susu kemudian dikirimkan ke puting oleh saluran yang terhubung dengan lobulus. Puting terletak di kulit payudara yang berfungsi untuk mengeluarkan susu yang dihasilkan oleh lobulus. Daerah berpigmen yang mengelilingi puting disebut areola (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Untuk gambar lebih jelas mengenai anatomi payudara normal manusia dapat dilihat pada gambar 2.1.



[Sumber : Centers for Disease Control and Prevention, 2001]

Gambar 2.1. Anatomi Payudara Normal Manusia

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

Kanker payudara adalah pertumbuhan sel atau jaringan payudara yang tidak terkontrol dengan frekuensi kejadian yang tinggi. Kanker payudara sering ditemukan di seluruh dunia dengan insidens relatif tinggi, yaitu 31% dari seluruh kanker yang dialami oleh wanita (Pazdur et al., 2008). *American Cancer Society* (2007) memperkirakan 460.000 pasien penderita kanker payudara meninggal antara 1990-2000. Kejadian kanker payudara di Indonesia menempati peringkat pertama berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) tahun 2007 yaitu angka kejadian untuk kanker payudara sebanyak 8.227 kasus atau 16,85 persen dan kanker leher rahim 5.786 kasus atau 11,78 persen (Aditama, 2010) dengan estimasi kejadian kanker payudara di Indonesia sebesar 26 per 100 000 perempuan (Ferlay, 2002).

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. Perempuan dapat mendeteksi apakah mereka memiliki sedikit bahkan kanker yang melekat pada dinding dada atau kulit dengan mengangkat tangan mereka di atas kepala mereka sambil berdiri di depan cermin. 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).

Pengobatan kanker payudara dilakukan bergantung pada tahap dan jenis kanker payudara. Pengobatan dapat berupa pembedahan, kemoterapi (herbal dan konvensional), terapi hormon, dan terapi radiasi. Biasanya digunakan satu atau lebih macam pengobatan untuk mendapatkan hasil yang lebih memuaskan.

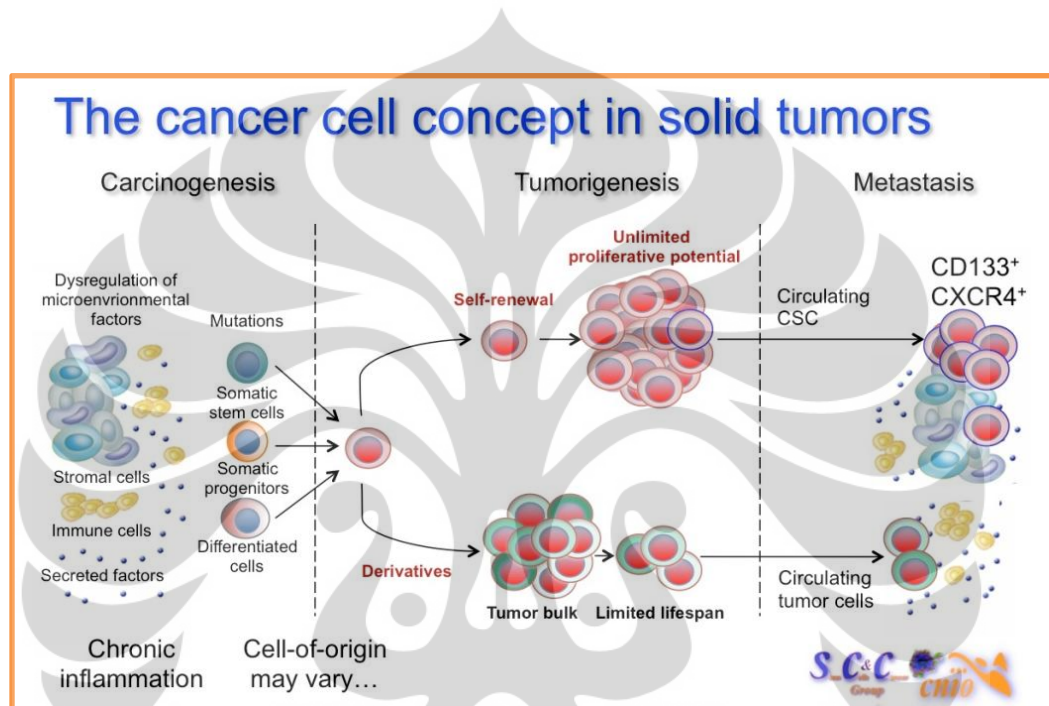
2.2 Sel Punca Kanker

Sel kanker telah lama dikenal sebagai populasi sel-sel yang memiliki fenotipe heterogen baik morfologi maupun fungsinya. Sebagian besar sel yang membentuk tumor dapat berdiferensiasi, namun sebagian kecil populasi sel tumor – kemudian dikenal sebagai sel punca kanker atau *cancer stem cell* – yang memiliki kemampuan memperbarui diri (*self renewal*) yang ekstensif dan dapat merekapitulasi patofisiologi tumor pada hewan coba (Al Hajj et al., 2003, Tang, Beng, dan Shazib, 2007).

Hipotesis sel punca kanker (Gambar 2.2) mengatakan bahwa tumor berasal dari sel punca normal atau sel progenitor melalui disregulasi proses *self renewal*. Hipotesis sel punca kanker menekankan bahwa hanya sebagian kecil populasi sel kanker yang dapat tersusun kembali menjadi sel tumor yang baru, sedangkan sebagian besar sel kanker yang lain mempunyai kapasitas yang terbatas dalam berpoliferasi dan berdiferensiasi. Kanker yang dikembangkan dari sel punca kanker yang berasal dari sel tumor awal (*Tumour Initiating Cell*) yang diinduksi oleh karsinogen. Sel tumor awal berupa sel punca normal atau sel progenitor dan dapat memperoleh sifat *stemness* ketika berkembang menjadi pra sel punca kanker. Adanya akumulasi epigenetik dan perubahan genetik, sel tumor awal dapat berkembang menjadi pra sel punca kanker, dengan tingkat keganasan dan diferensiasi tergantung pada kondisi lingkungan. Sebuah mutasi kualitatif onkogen atau gen supresor tumor pada pra sel punca kanker dapat menyebabkan berkembangnya pra sel punca kanker menjadi sel punca kanker yang kemudian menjadi sel tumor dengan heterogenitas selular karena mempunyai kapasitas berpoliferasi dan berdiferensiasi, serta membentuk kembali tumor baru pada lokasi yang jauh dari tempat tumor awal berasal. Secara histologis, proliferasi sel awal tumor dapat menyebabkan hiperplasia dan metaplasia, sedangkan proses

Universitas Indonesia

berkembangnya sel awal tumor menjadi pra sel punca kanker mungkin bertanggung jawab pada displasia yang akan menyebabkan pra sel punca kanker menjadi sel punca kanker yang berkembang menjadi karsinoma yang ireversibel. Selain itu, pra sel punca kanker dan sel punca kanker dapat berkembang menjadi prekursor tumor yang lain seperti tumor vaskulogenesis (Jian, 2008). Hipotesis proses terbentuknya kanker dapat dilihat pada gambar 2.2.



[Sumber: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, 2011]

Gambar 2.2. Hipotesis Sel Punca Kanker.

Hipotesis sel punca kanker didukung oleh bukti-bukti yang menunjukkan bahwa gen BRCA1 yang terlibat pada kanker payudara herediter ternyata berperan sebagai regulator nasib sel punca atau sel progenitor payudara normal. Kemudian suatu studi mendemonstrasikan bahwa sel punca kanker pada kanker payudara herediter (ditandai dengan BRCA1) juga bersifat heterogen, karena kemungkinan besar berasal dari sel-sel yang berbeda, misalnya mengandung sel punca CD44⁺/CD24⁻ dan sel punca CD133⁺ (Wright et al., 2008). Walaupun kedua populasi sel punca tersebut berbeda asalnya, namun keduanya memiliki

gen-gen “*stemness*” yang umum, seperti OCT3/4, Notch1, ALDH1, *Fgfr1* dan SOX2 (Ginestier, 2007).

Eksresi gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc diketahui dapat menginduksi pembentukan sel punca dari sel-sel yang telah terdiferensiasi seperti fibroblast, yang disebut dengan *induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007). Keterkaitan ekspresi SOX2 dengan kanker payudara sporadik dengan *basal-like phenotype* telah diteliti (Rodriguez-Pinilla, 2007), namun pada umumnya publikasi yang melaporkan tingkat ekspresi maupun polimorfisme gen SOX2, OCT3/4, Klf4 dan c-Myc masih sulit ditemukan.

Walaupun keberadaan subpopulasi sel punca pada kanker telah diketahui, namun kemaknaan klinis dari temuan tersebut belum dapat dijelaskan dengan baik. Dugaan utama model sel punca kanker adalah perilaku klinis seharusnya sangat bergantung pada populasi sel punca kanker, baik secara kuantitatif (jumlah relatif atau absolut sel punca kanker) maupun kualitatif yang berhubungan dengan gambaran biologis sel punca kanker (Tang, Beng, dan Shazib, 2007). Kegagalan terapi radiasi ternyata disebabkan karena tidak dapat membunuh subpopulasi sel CD133⁺ yang menginisiasi tumor.

2.3 Gen SOX2

SRY (*Sex Determining Region Y*) *box-2* yang dikenal sebagai SOX2 adalah suatu faktor transkripsi yang esensial untuk mengatur pluripotensi dari sel punca. SOX2 yang berupa gen tanpa intron terletak dalam sebuah intron dari gen yang disebut *SOX2 overlapping transcript* (SOX2OT). Gen SOX2 berada pada kromosom manusia 3q26.3-q27 (Gambar 2.3) menghasilkan produk SRY (wilayah penentuan kromosom Y)-*box 2*, yang terdiri 317 asam amino panjang (34,3 kDa), merupakan domain grup mobilitas tinggi (*High Mobility Genes - HMG*) yang berisi faktor transkripsi *totipotent* dan mengontrol status pluripoten sel (Rodda, 2005). Gen ini banyak ditemukan pada banyak hewan dan memainkan peran penting dalam sel punca, organogenesis dan pertumbuhan (Kamachi, Uchikawa, dan Kondoh, 2000, Wegner, 1999).



[Sumber : www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657, 14 Januari 2012]

Gambar 2.3. Letak Gen SOX2 pada Kromosom Manusia.

Sejauh ini telah banyak ditemukan hubungan antara faktor transkripsi SOX2 dan kanker pada manusia (Dong, Wilhelm, dan Koopman, 2004). Contohnya, SOX2 telah ditemukan sebagai antigen immunogenik pada 41% pasien kanker paru-paru (Gure et al., 2000) dan 29% pasien meningioma (Comtesse et al., 2005). Hasil *immunohistochemistry* menemukan bahwa SOX2 berperan dalam stadium lanjut karsinogenesis seperti invasi dan metastasis dari *pancreatic intraepithelial neoplasia* (Sanada et al., 2006). SOX2 juga berperan dalam *gastric carcinogenesis* (Li, 2004) dan kanker prostat (Sattler et al., 2000). Lebih jauh lagi ekspresi SOX2 yang berlebihan juga ditemukan pada 43% *basal cell-like breast carcinoma* (Rodriguez-Pinilla et al., 2007).

Pada suatu studi yang dilakukan oleh Yupeng Chen, dkk (2008) ditemukan bahwa peningkatan ekspresi gen SOX2 berkorelasi dengan peningkatan tingkat keparahan kanker payudara dan juga diketahui bahwa SOX2 menyebabkan proliferasi sel kanker payudara dengan memfasilitasi transisi G1/S dan meregulasi ekspresi gen cyclin D1 (CCND1). Studi ini juga menemukan bahwa protein SOX2 berpasangan dengan protein β -catenin dalam mengaktivasi gen CCND1 terkait sifat onkogeniknya.

2.4 Sel Fibroblas

Tidak akan ada sel yang dapat hidup tanpa dukungan dari lingkungan mikronya yang disebut sebagai relung (Bissell dan LaBarge, 2005). Menurut Sujata dan Chaudhuri (2008), dalam relung terdapat sel-sel endotel vaskuler dan sel-sel perawat (*nurse cells*) yang menghasilkan berbagai faktor serta adanya

matriks ekstrasel pendukung yang dibutuhkan untuk bertahan hidup. Menurut Baguley (2006), selain mengandung sel punca, relung juga mengandung sel endotel vaskuler, sel perisit, dan sel stromal, serta sel-sel imun dan suplai saraf. Sel fibroblas sendiri merupakan sekelompok sel yang mampu menopang pertumbuhan sel punca dengan menghasilkan berbagai faktor pertumbuhan dan matriks ekstraseluler.

Menurut Raghu Kalluri dan Michael Zeisberg (2006), kemampuan sel fibroblas ini dimanfaatkan oleh sel punca kanker untuk memfasilitasi keganasannya seperti pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) untuk mencukupkan kebutuhan nutrisi sel dan penyebarannya. Sel fibroblas normal berbeda dengan sel fibroblas kanker. Sel fibroblas kanker tidak memiliki inhibisi pertumbuhan yang *density dependent*. Ketergantungan sel fibroblas ini terhadap faktor pertumbuhan rendah dengan kemampuan berproliferasi yang tidak terbatas, tidak ada hambatan migrasi, dan *adhesiveness*nya rendah. Selain itu, sel ini juga memiliki morfologi bentuk bundar. Sebaliknya, sel fibroblas normal yang memiliki morfologi rata dan tidak memiliki sifat-sifat tersebut. Keberadaan sel fibroblas kanker dapat meningkatkan jumlah sel punca kanker (diidentifikasi dengan adanya penanda CD44⁺/CD24⁻) pada *mammospheres* dan sebaliknya sel fibroblas normal mampu menginhibisi efek dari pertumbuhan tumor (Kanojia dan Chen, 2011). Menurut Christina H. Stuelten, dkk., sel fibroblas, baik normal maupun kanker masing-masing memiliki sifat yang mampu mengagonis maupun mengantagonis pertumbuhan kanker.

2.5 Isolasi RNA

RNA merupakan makromolekul biologis beruntai tunggal yang memiliki sejumlah fungsi yang berbeda. Terdapat 3 jenis RNA, yaitu mRNA (messenger RNA), tRNA (transfer RNA), dan rRNA (*ribosomal RNA*). *Messenger RNA* ditranskripsi dari DNA, berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis protein. Asam amino untuk sintesis protein dikirim ke ribosom oleh tRNA, sedangkan rRNA berperan dalam sintesis protein dalam ribosom.

RNA relatif tidak stabil dan mudah rusak terutama oleh RNAase, sehingga dalam isolasinya harus hati-hati dan menghindari kontaminasi, salah satu caranya

adalah dengan memakai sarung tangan. RNAase adalah suatu molekul yang sangat stabil, tidak membutuhkan kofaktor, sangat efektif pada konsentrasi rendah dan banyak terdapat pada debu dan kulit manusia. Saat melakukan ekstraksi RNA, dilakukan deproteinisasi untuk memisahkan RNA dari protein sehingga RNA dapat diendapkan dengan etanol. Suatu reagen yang berupa *chaotropic agent* atau deterjen, yaitu guanadinium tiosianat umumnya digunakan dalam ekstraksi RNA untuk mendenaturasi protein dan sebagai inhibitor RNAse yang baik (Walker dan Rapley, 2000).

Konsentrasi RNA dapat dihitung dengan menggunakan spektrofotometri UV yang dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dimana 1 unit absorbansi setara dengan 40 µg/ml RNA. Kemurnian RNA dapat dilihat dari nilai perbandingan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dsan 280 nm (A_{260}/A_{280}). Nilai A_{260}/A_{280} harus ~ 2.1 yang menandakan bahwa RNA telah murni. Nilai perbandingan ini dapat dipengaruhi oleh pH lingkungan yang dapat menyebabkan nilainya semakin rendah dan mengurangi sensitifitas dalam pengukuran kontaminasi protein, oleh karena itu dibutuhkan sistem dapar ketika akan mengukur A_{260}/A_{280} (Wilfinger, Mackay, dan Chomczynski, 2000).

2.6 Normalisasi mRNA

Metode umum yang digunakan untuk analisis RNA adalah *Northern blotting* dan hibridisasi in situ (Parker & Barnes, 1999), *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (Weis et al., 1992), *Rnase protection assay* (Hod, 1992), dan kuantitatif *Real Time – Polymerase Chain Reaction* (qPCR) (Bustin, 2002).

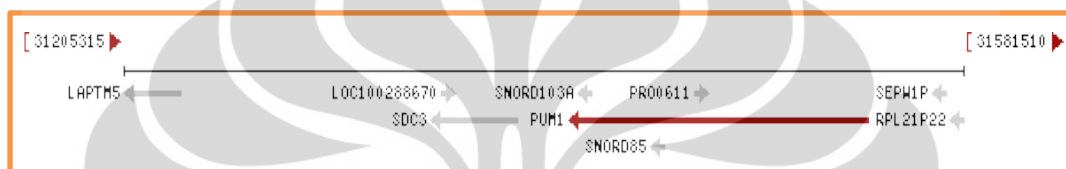
Pada saat proses analisis RNA dapat terjadi variasi yang terjadi dalam ekstraksi RNA sehingga memengaruhi jumlah mRNA yang akan diamplifikasi. Variasi ini dapat memengaruhi analisis level RNA karena mRNA adalah cetakan yang digunakan untuk mensintesis cDNA oleh enzim reverse transcriptase yang selanjutnya akan diubah menjadi *double strand* DNA oleh Taq polymerase. Oleh karena itu, dilakukan langkah-langkah untuk meminimalisir variasi yang mungkin yang terjadi yang disebut sebagai normalisasi.

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

Housekeeping genes bertanggung jawab atas pemeliharaan dan aktivitas sel dan produknya penting bagi fisiologi sel. Gen ini disebut *housekeeping genes* karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan fungsional umum dan penting di sebagian besar tipe sel dan tidak bergantung pada histologi sel. *Housekeeping genes* yang ideal adalah ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada kondisi percobaan yang berbeda. *Housekeeping genes* yang dapat digunakan antara lain komponen sitoskeleton (β -actin), *major histocompatibility complex* (β -2-microglobulin), jalur glikolisis (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH)), sintesis purin (*hypoxanthin ribosyltransferase*), *protein folding* (cyclophilin), atau sintesis subunit ribosom (rRNA) (Vandesompele, 2002).

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

PUM1 merupakan gen yang terletak dalam kromosom manusia 8q24.21 (Gambar 2.4) dan diduga berperan penting dalam embriogenesis, pertumbuhan dan diferensiasi sel. Gen tersebut mengkode keluarga protein PUF yang memiliki peran penting dalam proses pengikatan RNA. Protein tersebut terkait dengan protein Pumilio pada *Drosophila*. Protein yang dikode oleh PUM1 ini memiliki bagian khusus untuk mengikat RNA dan menjadi regulator translasi dengan mengikat pada ujung 3' mRNA yang tidak diterjemahkan (National Center of Biotechnology Information, 2010).



[www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 5 Februari 2012]

Gambar 2.4. Letak Gen PUM 1 pada Kromosom Manusia.

2.7 Identifikasi Sel Punca Kanker Payudara

Sel punca kanker merupakan bagian kecil dari populasi sel kanker yang memiliki karakteristik yang mirip dengan sel punca normal. Sel punca kanker memiliki kemampuan pembaruan diri dan diferensiasi seperti sel punca normal. Berkembangnya metode identifikasi sel punca kanker berawal pada sistem hematopoetik dengan menggunakan penanda permukaan sel yang dikenal dengan *Cluster of Differentiation* (CD). Identifikasi sel punca kanker payudara dilakukan dengan melihat ekspresi penanda permukaan CD44 yang tinggi dan CD24 yang rendah. Identifikasi ini pertama kali dilakukan oleh Al-Hajj, dkk.

Molekul CD44 yang merupakan glikoprotein transmembran mengandung banyak residu fosforin dan beberapa ikatan disulfida. CD44 memainkan peranan penting dalam *cell mediated immunity*, sirkulasi limfosit, aktivasi sel T, adhesi ke sel lainnya dan matriks intraseluler, sebagai metabolisme *hyaluronida*, transduksi sinyal melewati membran sel, dan sekresi faktor pertumbuhan. Ekspresi berlebihan pada gen ini terjadi pada keganasan dan kemampuan metastasis sel kanker (Azamris et al., 2003, h.28; Bolodeoku, n.d., h.189).

Di sisi lain, molekul CD24 merupakan suatu glikoprotein, *glycylphosphatidil-inositol* (GPI) yang diekskresikan pada sel hematopoietik dan sel non-hematopoietik. Molekul CD24 diekspresikan pada saat regenerasi jaringan. CD24 akan diekspresikan secara berlebihan pada keadaan *hematological malignancies* dan pada tumor padat seperti gastrik, renal, nasofaring, hepatoseluler, kolon, dan kanker paru-paru (Motari et al., 2009, h.2).

2.8 Analisis Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ secara Spektrofluorometri

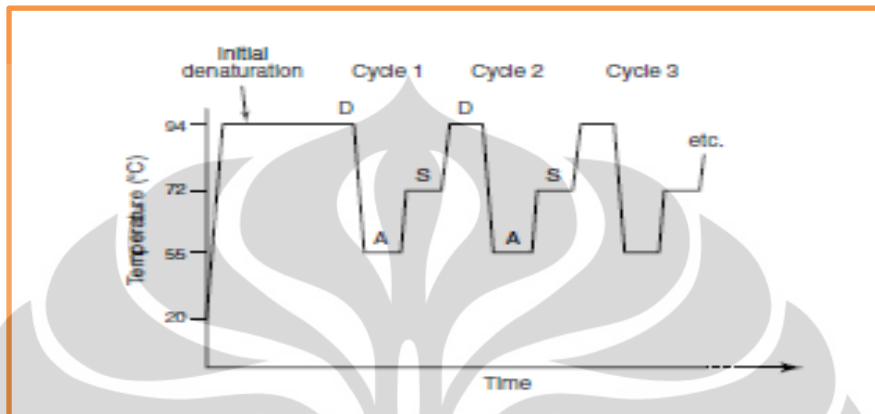
Pada tahun 1944, Albert Coons menunjukkan bahwa antibodi dapat diberi label dengan suatu molekul yang berfluoresensi. Molekul fluorofor dapat menyerap satu panjang gelombang dan memancarkan cahaya pada panjang gelombang yang lain. Fluoresensi adalah peristiwa dimana energi yang diserap suatu benda dikembalikan ke dalam bentuk energi yang lain. Ada tiga tahapan mekanisme agar fluoresensi dapat terjadi, yaitu (Handoyo, 2003, h.47) yaitu *excitation* (energi diserap oleh fluoroflor), *excited-state life time* (terjadi perubahan konformasi dan interaksi dengan lingkungan sekitar, sekitar 1-10 nanodetik), dan *fluorescence emission* (foton dipancarkan, mengembalikan fluoroflor ke keadaan awal, terjadi perbedaan energi yang terdeteksi oleh alat).

Sumber cahaya yang digunakan pada spektrofluoresensi adalah yang dapat menghasilkan spektrum yang memiliki energi kontinu yaitu lampu tungstenhalogen, lampu merkuri, dan lampu xenon. Detektor yang digunakan adalah detektor *photomultiplier* yang dapat menjangkau seluruh rentang panjang gelombang *UV-visible*.

2.9 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) adalah suatu teknologi dimana molekul RNA dikonversi menjadi sekuens complementary DNA (cDNA) dengan menggunakan reverse transcriptase (RT), dan cDNA yang terbentuk diamplifikasi dengan prinsip yang sama dengan PCR standar. Secara garis besar, PCR terdiri dari tiga langkah (Application Manual, 1995) yaitu: (i) denaturasi, yaitu pemanasan awal pada suhu 95°C untuk mendenaturasi kompleks DNA secara komplit. (ii) Penempelan primer (primer annealing) pada temperature

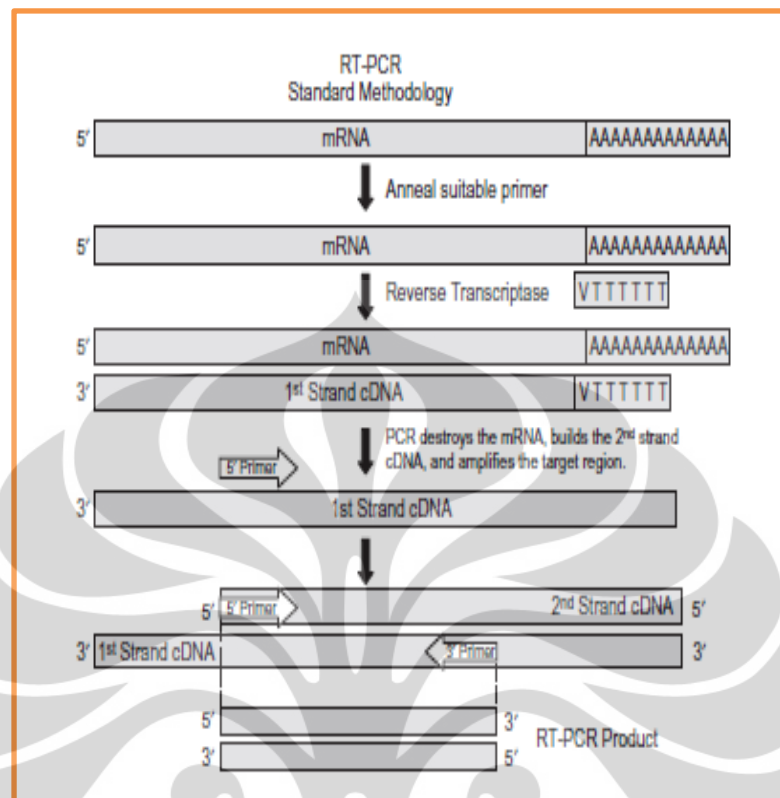
55-72°C. (iii) Polimerisasi untai baru DNA oleh Taq polymerase, yaitu secara normal dilakukan pada temperatur 72°C (merupakan temperatur optimal Taq polymerase). Jumlah siklus yang diperlukan oleh sebagian besar PCR adalah 25-40 siklus.



[Sumber : McPherson dan Moller, 2006]

Gambar 2.5. Kurva Proses PCR.

RT-PCR terdiri dari dua proses, yaitu (i) sintesis cDNA dari RNA dengan menggunakan *reverse transcriptase* (MMLV, AMV, *Modified RNase H- Enzyme* atau Mn^{2+} dependent) dan (ii) amplifikasi cDNA. Sintesis cDNA terjadi melalui dua langkah, yaitu (i) mRNA diinkubasi dengan *reverse transcriptase*, suatu enzim yang diperlukan oleh mRNA untuk sintesis cDNA ; (ii) mRNA yang masih berikatan cDNA yang dihasilkan harus dihilangkan dengan cara dihidrolisis dengan alkali atau enzim sehingga didapat cDNA berutas tunggal (Gilbert, 2006). Pada proses ini, RNA ditambahkan primer yang sesuai kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 70°C selama 5 menit untuk mendenaturasi RNA, kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 5 menit untuk proses penempelan primer dan terakhir dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit untuk menginaktifkan *reverse transcriptase*. Berikut skema proses RT-PCR :



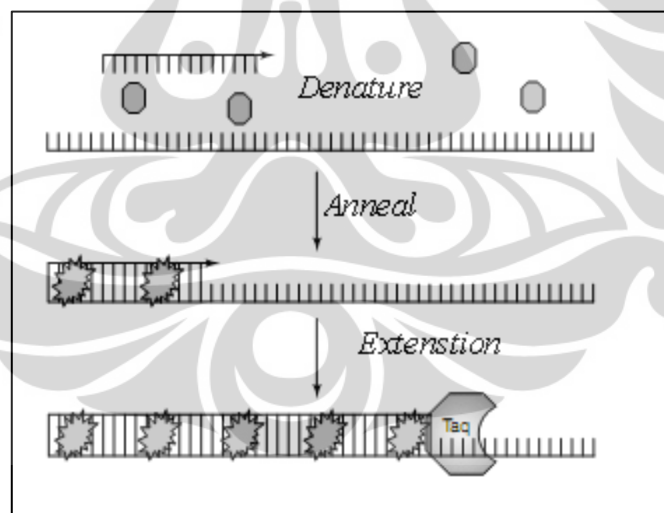
[Sumber : Fairell, 2005]

Gambar 2.6. Proses RT-PCR

Enzim *reverse transcriptase* disebut “RNA-dependent DNA polymerase”. Beberapa jenis enzim *reverse transcriptase* yang dapat digunakan, yaitu (i) AMV yang didapat dari virus *Avian Myeloblastosis*; (ii) MMLV yang didapat dari virus *Moloney Murine Leukemia*; (iii) *modified RNase H-enzyme*; (iv) rTth yang diperoleh dari *Thermus thermophilus* (Mn²⁺-dependen). Penggunaan *one step* RT-PCR yang dilakukan dengan satu langkah (*one step*) dimana proses *reverse transcription* dan proses PCR dilakukan dalam satu proses (*one tube*) dipilih untuk mengurangi langkah kerja sehingga akan meningkatkan efisiensi dan efektifitas karena semakin sedikit langkah kerja yang dilakukan akan semakin mengurangi kesalahan yang mungkin dilakukan (Bustin dan Nolan, 2004).

2.10 Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Analisis kuantitatif ekspresi gen SOX2 dilakukan dengan menggunakan *Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (real time RT-PCR)*. Prinsip kerja *real time RT-PCR* tidak jauh berbeda dengan RT-PCR konvensional. Perbedaan dasar antara keduanya yaitu: (i) Analisis amplicon menggunakan reporter fluoresen dan tidak dengan menggunakan gel elektroforesis konvensional serta (ii) Amplicon dapat dianalisis dari setiap siklus, berbeda dengan PCR konvensional yang hanya mendeteksi pada saat *end-point*. Penelitian ini menggunakan fluorokrom SBRY® Green I yang mengikat pada alur minor dari DNA beruntai ganda yang tereksitasi pada 498 nm dan teremisasi pada 522 nm. SBRY® Green I digunakan secara luas karena lebih murah dibandingkan dengan menggunakan *probe* fluoresen, mudah untuk digunakan dan tidak mengganggu kerja dari DNA *polymerase*. Namun, kelemahan dari SBRY® Green I merupakan bukan *sequence specific dye* sehingga dapat berikatan dengan untaian DNA ganda manapun.



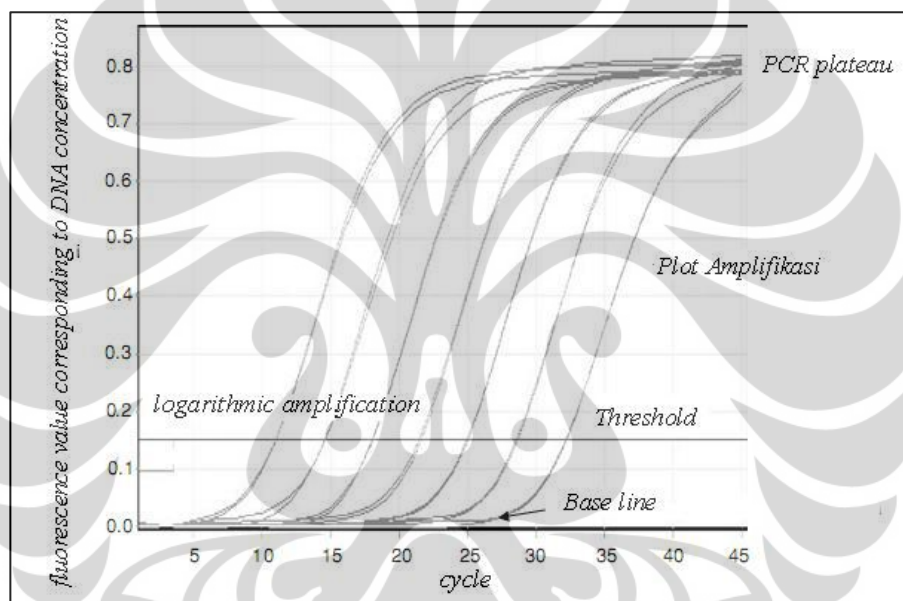
[Sumber: Michael, 2006]

Gambar 2.7. Skema Kerja dari SBRY® Green I

Selama denaturasi dimana yang ada merupakan single strand DNA maka SBRY® Green I berada dalam keadaan yang tidak terikat sehingga tidak

memberikan signal fluoresen. Sedangkan selama fase annealing dan fase ekstensi SBRY® Green I berikatan dengan ampikon yang berupa double strand DNA sehingga memberikan peningkatan sinyal fluoresens yang signifikan.

Peningkatan sinyal yang dideteksi oleh reporter menunjukkan peningkatan jumlah produk. Karena intensitas dari fluoresens dapat dideteksi dan diukur pada setiap siklus maka dapat diketahui pada siklus berapa terdapat peningkatan sinyal fluosens secara signifikan. Hubungan antara jumlah siklus dan peningkatan sinyal fluoresens terlihat dalam suatu plot ampikon seperti pada Gambar 2.8.



[Sumber: Cambridge University Press, 2010]

Gambar 2.8. Suatu Plot Amplifikasi pada *Real-Time* PCR

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

Universitas Indonesia

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

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

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

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

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

Kemudian perbandingan level ekspresi didapat dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Perbandingan level ekspresi gen} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.4)$$

2.11 Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis adalah suatu gaya yang digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan perbedaan ukuran dan muatan molekul dengan melewati molekul pada matriks gel (Boyer, 2000). Molekul yang ingin dianalisis ditempatkan pada sumur kemudian dialiri muatan listrik dan hasilnya molekul

akan bergerak dengan kecepatan yang bergantung pada massa dan muatan molekul.

Gel yang digunakan adalah polimer *crosslinked* yang mempunyai komposisi dan porositas yang dipilih berdasarkan struktur dan berat spesifik zat yang ingin dianalisis (Robyt, White, dan Bernard, 1990). Ada 2 jenis gel yang umum digunakan dalam elektroforesis, yaitu gel agarose dan gel akrilamid.

Metode elektroforesis dengan agarose merupakan metode yang paling sering dipakai. Metode ini dapat digunakan untuk asam nukleat dengan ukuran 50bp – 30kb. Konsentrasi agarose yang umumnya dipakai berkisar antara 0,5% - 4%. Untuk memisahkan asam nukleat ataupun produk PCR dengan ukuran diatas 500bp, umumnya dipakai agarose 0,8% - 1%. Ketika digunakan untuk memisahkan sampel dengan ukuran dibawah 500bp, konsentrasi agarose yang umumnya dipakai adalah 1,2% - 4%. Perlu diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi yang dipakai, maka partikel akan semakin sulit bergerak, sehingga agarose konsentrasi tinggi hanya dipakai untuk memisahkan sampel dengan ukuran sangat kecil. Selain menggunakan agarose konsentrasi tinggi, akrilamid juga dapat digunakan untuk memisahkan sampel dengan ukuran sangat kecil, bahkan lebih disukai karena pemisahan yang dihasilkan lebih baik. Hanya saja pemakaian elektroforesis gel akrilamid lebih kurang disukai karena kemungkinan sobeknya gel ketika akan dianalisis sangat tinggi.

Gel agarose sering juga disebut sebagai *submarine gel*, karena gel yang terbentuk diletakkan secara horizontal pada *chamber*nya dan ditenggelamkan dalam *running buffer*. *Running buffer* yang dipakai dalam elektroforesis gel agarose ada 2, yaitu TBE dan TAE. TBE memiliki kapasitas dapar yang lebih tinggi dibandingkan TAE sehingga akan dapat memisahkan sampel berukuran kecil dengan baik. Untuk sampel yang berukuran besar biasanya dipakai TAE. TAE memiliki kapasitas dapar yang lebih rendah, namun kelebihan utama yang dimilikinya adalah dapat dibuatnya larutan *stock* yang dapat disimpan lama sehingga lebih praktis.

DNA bermuatan negatif sehingga DNA akan bergerak menembus pori gel dari elektroda negatif menuju elektroda positif. Pergerakan tersebut dipengaruhi oleh tegangan yang digunakan, konsentrasi agarose, dan ukuran DNA. Molekul

yang lebih kecil bergerak lebih cepat daripada molekul yang lebih besar. Untuk mengamati pemisahan yang terjadi digunakan pewarna, contohnya etidium bromida, yang akan berinterkalasi dengan DNA dan akan muncul sebagai pita berwarna putih di bawah sinar UV (Franks,1999).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan dari Februari 2012 sampai 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 Alat

Alat yang digunakan adalah *Biosafety Cabinet* (BSC) [Esco, China], CO₂ Inkubator IL-60160-1491 [Barnstead, USA], Mikroskop Olympus CKX-41 SF dengan Lensa WHB-10X/20 [Olympus, Japan], sentrifus [TOMY Digital Biology, Jepang], mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], Pipet mikro 10µl [Biorad, USA], Pipet mikro 200 µl dan 1000 µl [Gilson, Perancis], *pipette aid* [Biorad, USA], *Haemocytometer Chamber* [Assistant, USA], timbangan analitik [Adventurer], Biorad Minioption RT-PCR [Biorad, USA], PCR *Thermal Cycler* PTC-200TM *Programmable Thermal Controller* [MJ Research, USA], Spektrofotometer NanoDrop ND2000 [Thermo Scientific, USA], alat elektroforesis [Biorad, USA], *UV transilluminator* [Biorad, USA], autoklaf [Hirayama, Jepang], *ice maker* [Hirayama, Jepang].

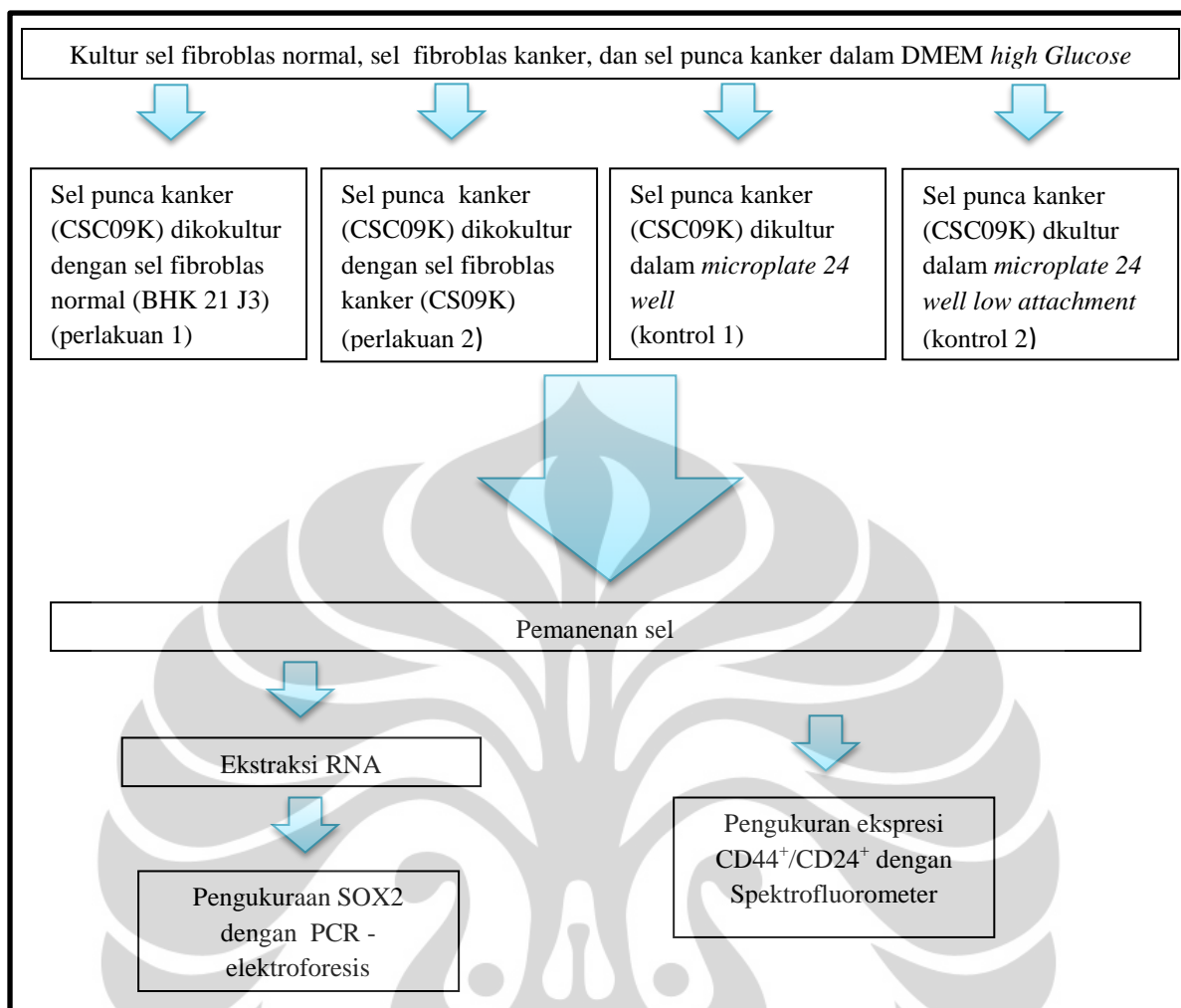
3.3 Bahan

Kultur sel punca kanker payudara CSC09K dalam medium kultur DMEM *high glucose*, kultur sel fibroblas kanker CS09K dalam medium kultur DMEM *high glucose*, kultur sel fibroblas BHK (*Baby Hamster Kidney*) BHK 21 J3 dalam medium kultur DMEM *high glucose*, HEPES (N-2- Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid) [Invitrogen, USA], FBS (Fetal Bovine Serum) [Invitrogen, USA], Penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) [Sigma, USA], natrium bikarbonat 7,5% [Invitrogen, USA], PBS (*Phosphate Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA [Sigma, USA], *trypan blue* [Sigma, USA], *Collagenase* IV 10 mg/ml (Gibco, USA), BSA (*Bovine Serum Albumine*) [Sigma Aldrich, USA], Rneasy Mini Kit [Qiagen,

Jerman], β -mercaptoetanol, Bio-rad iScript™ One Step RT-PCR Kit with SYBR® Green, 2000 [Bio-rad, USA], OneStep RT-PCR [Qiagen, Jerman], $MgCl_2$ [Qiagen, Jerman], *RNAse inhibitor* [Invitrogen, USA], primer SOX2 [Eurogentec, Singapore], primer PUM1 [1stBase, Indonesia], akrilamid, bisakrilamid dan trisbase [Promega, USA], ammonium persulfate [Promega, USA], TEMED (N,N,N',N' Tetrametiletilenediamin) [Biorad, USA], 6x loading dye [Vivantis, Malaysia], etidium bromida [Promega, USA], Penanda GeneRuler™ 100bp DNA Ladder [Invitrogen, USA], Pipet serologi [Sigma, USA], Pipet Tips Steril [Axigen, USA], tabung konikal 15 ml dan 50 ml [Corning, USA], *flask* [Corning, USA], *microplate 24 well* [Falcon,], *microplate 24 well low attachment* [Sigma, USA], tabung mikrosentrifus [Axygen, USA].

3.4 Cara Kerja

Sel punca kanker payudara yang telah dikultur pada medium DMEM dikokultur dengan sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker yang telah diekstraksi oleh tim peneliti IHVCB-UI dan kemudian dipanen ketika sel mencapai konfluensi sekitar 80%-90%. Sebanyak 150.000 sel digunakan untuk pengukuran level ekspresi gen SOX2 menggunakan real time PCR dengan terlebih dahulu mengekstraksi RNA, sedangkan 100.000 sel digunakan untuk pengukuran ekspresi penanda permukaan $CD44^+/CD24^+$ menggunakan spektrofлуorometer. Perhitungan sel dilakukan dengan menggunakan haemocytometer dengan pewarnaan *trypan blue*.



Gambar 3.1. Skema Alur Kerja Penelitian

3.4.1 Persiapan Media Kultur DMEM *high glucose*

Sebanyak 42,25 ml DMEM ditambahkan dengan 5 ml FBS 10%, 500 μ l *penstrep*, buffer *Sodium-Hepes* 1M 1 ml dan 1,25 ml natrium bikarbonat kemudian dikocok homogen secara seksama untuk mencegah timbulnya buih lalu disaring dengan penyaring bakteri 0,2 μ m. Penyiapan medium dilakukan pada suhu 25°C di dalam *Biosafety cabinet*.

3.4.2 Kultur Sel

3.4.2.1 Kultur Sel Fibroblas Normal dan Kanker

Sel fibroblas kanker CS09K dan sel fibroblas normal BHK 21 J3 diambil dari nitrogen cair dan dipindahkan ke dalam BSC melalui transfer box. Setelah suspensi sel mencair, suspensi tersebut dipindahkan ke dalam tabung konikal 15

ml dan ditambahkan 4 ml medium kultur DMEM *high glucose*, lalu disentrifus dengan kecepatan 300 xg selama 30 menit. Kemudian, supernatan hasil sentrifus didekantasikan dan pelet sel diresuspensi dalam 1 ml medium kultur dan dipindahkan ke dalam *flask* T-25 yang berisi 6 ml medium kultur untuk dikultur. Kemudian sel tersebut diinkubasi dalam inkubator dengan kandungan 5% CO₂ dan bersuhu 37°C.

Medium kultur sel diganti setiap kali terlihat menguning kecoklatan. Pergantian medium dilakukan dengan membuang larutan medium yang berada dalam *flask* dengan menggunakan pipet serologi 10 ml dan kemudian dimasukkan 7 ml medium kultur yang baru ke dalam *flask* tersebut.

Kultur sel yang telah 80 - 90% konfluen segera dipanen dengan menggunakan tripsin-EDTA. Caranya dengan memipet keluar medium dalam *flask* dan kemudian dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 1x sebanyak 5 ml. Sebanyak 1 ml tripsin-EDTA dipipet masuk ke *flask*, lalu digoyang-goyangkan sampai tripsin-EDTA tersebar merata. *Flask* diinkubasi selama 5-10 menit sambil sesekali diketuk-ketuk. Pelepasan sel dari dasar *flask* diamati dengan mikroskop *inverted*. Tripsin-EDTA dalam *flask* kemudian diinaktivasi dengan medium kultur sebanyak 2 ml. Suspensi sel dimasukkan ke dalam tabung konikal 15 ml dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 300 xg. Pelet sel yang terbentuk diresuspensi dengan medium kultur lalu dihitung dengan *haemocytometer*.

3.4.2.2 Kultur Sel Punca Kanker Payudara

Sel punca kanker payudara CSC09K dikultur dalam *microplate low attachment 24 well*. Sel kanker payudara CS09K yang telah dipanen dihitung dengan *haemocytometer*. Kemudian suspensi sel tersebut ditambahkan medium sejumlah tertentu dan dihomogenkan agar dapat dikultur di dalam *microplate low attachment* dengan jumlah 500.000 sel setiap *well*nya dengan volume masing-masing *well* sebesar 1 ml. Sel punca yang telah membentuk *mammosphere* dan telah konfluen dipanen dengan cara menghomogenkan medium dalam *well* dan dipindahkan ke tabung konikal 15 ml untuk disentrifus. Pelet sel hasil sentrifus kemudian disuspensikan dalam 1 ml medium kultur dan dihitung dengan

haemocytometer. Sel punca kanker payudara tersebut kemudian dipakai untuk ko-kultur dan sebagai kontrol dalam analisis.

3.4.3 Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara dengan Sel CS09K dan Sel BHK 21 J3

Sebanyak 250.000 sel punca diresuspensikan ke dalam 1 ml medium kultur dan dikultur pada *microplate* 24 *well* dengan perlakuan berbeda tiap *well*. Sebelum sel di ko-kultur, sel stromal harus disiapkan terlebih dahulu dengan mengkultur suspensi sel stromal pada *well* sampai 80–90% *confluent*. Kemudian dilakukan pemanenan sel punca pada hari ke-2 dan hari ke-4. *Well* yang dipakai pada hari ke-2 beda dengan hari ke-4. Masing-masing *well* diberi perlakuan yang sama dengan hari analisis yang berbeda. Pemanenan dilakukan dengan menghomogenkan media secara perlahan dalam tiap *well* dan kemudian dipipet ke dalam tabung konikal 15 ml. Setelah itu, ditambahkan *collagenase* IV 10 mg/ml sebanyak 200 μ l ke dalam *well* tersebut dan diinkubasi selama 5 menit. Hasil inkubasi tersebut kemudian dipipet ke dalam tabung konikal 15 ml yang sama dan disentrifus pada 300 xg selama 10 menit. Sel stromal akan tertinggal pada *plate*.

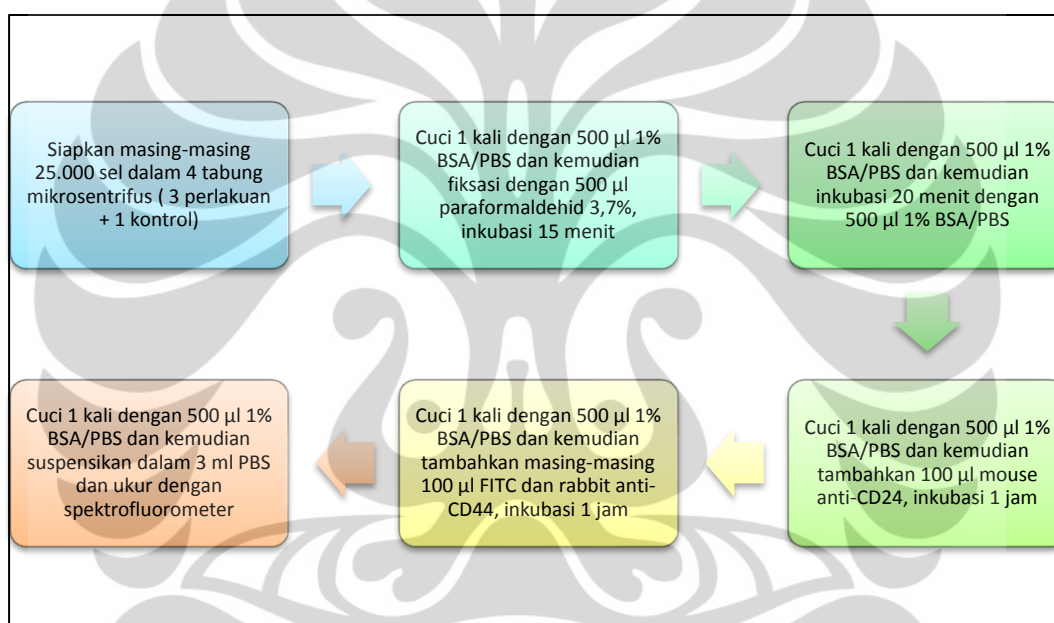
3.4.4 Analisis Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ secara Spektrofluorometri

Sel yang digunakan adalah 100.000 sel dari masing masing perlakuan tersebut. Sejumlah sel tersebut dibagi dalam 4 tabung mikrosentrifus 1,5 ml dengan jumlah 25.000 sel masing-masing tabung. 1 perlakuan sebagai kontrol, sedangkan 3 perlakuan sebagai sampel dilakukan dengan kondisi yang sama.

Masing-masing perlakuan tersebut dicuci dengan larutan 1% BSA/PBS (*Phosphate Buffered Saline/Bovine Serum Albumine*) 500 μ l sebanyak 1 kali. Selanjutnya difiksasi dengan larutan 3,7% paraformaldehid 500 μ l selama 10 menit. Hasil fiksasi tersebut kemudian dicuci dengan 500 μ l 1% BSA/PBS dan diinkubasi dengan 500 μ l 1% BSA/PBS selama 20 menit. Kemudian ditambahkan *mouse antibody anti-CD24* pada 3 perlakuan sampel dan diinkubasi selama 1 jam. Setelah itu, 3 perlakuan sampel tersebut dicuci dengan 500 μ l 1% BSA/PBS dan ditambahkan *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) sebagai antibodi sekunder serta *rabbit antibody anti-CD44* yang terkonjugasi dengan rhodamine isothiocyanate.

Pada tabung kontrol tidak ditambahkan antibodi. Kemudian diinkubasi selama 1 jam. Selanjutnya, sampel dan kontrol dicuci dengan menggunakan larutan 1% PBS/BSA 500 μ l sebanyak 2 kali dan diresuspensikan ke dalam larutan PBS 3 ml.

Pengukuran penanda permukaan CD24⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan pengukuran penanda permukaan CD44⁺ dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm. Alur kerja analisis ekspresi CD44⁺/CD24⁺ secara skematik dapat dilihat pada gambar 3.2.

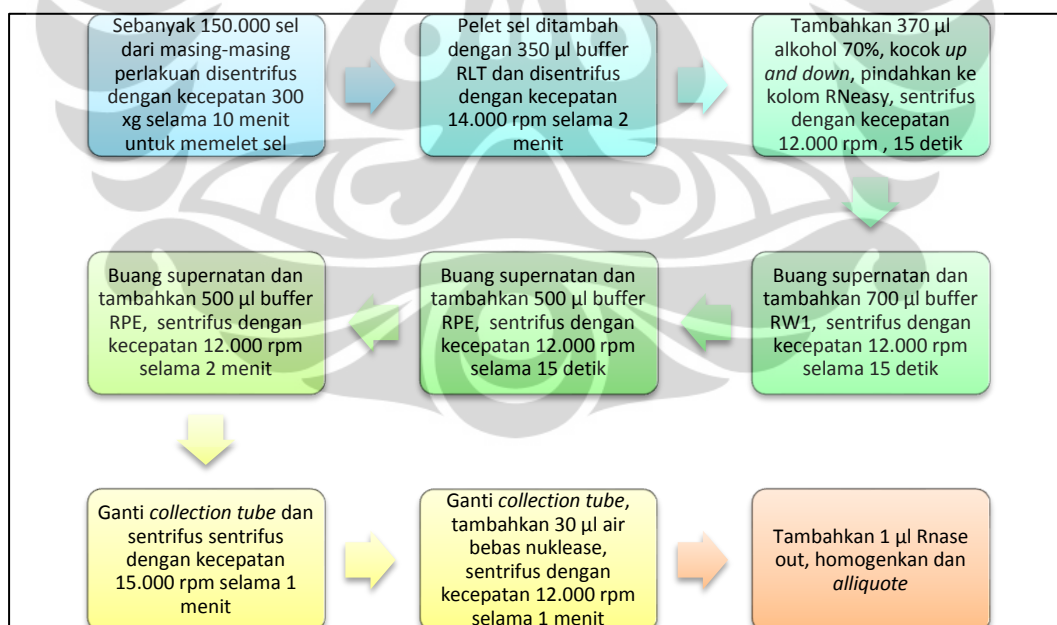


Gambar 3.2. Skema Alur Kerja Analisis Ekspresi CD44⁺/CD24⁺

3.4.5 Ekstraksi Total RNA

Ekstraksi total RNA dilakukan dengan menggunakan RNeasy Mini Kit. Sertifikat analisis dapat dilihat pada lampiran. Prosedur yang digunakan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh produsen. Setelah ditambahkan buffer RLT, suspensi sel dihomogenkan lalu dilewatkan pada spin kolom Qiashredder dan disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. Kemudian ditambahkan 350 μ l etanol 70 % dan dihomogenkan. Kemudian 700 μ l larutan yang terdapat dalam tabung mikrosentrifus dilewatkan pada kolom spin RNeasy disentrifus

dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang kemudian dicuci dengan 700 µl buffer RW1 yang mengandung guanidin tiosianat dan etanol dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Selanjutnya membran spin kolom dicuci dengan 500 µl buffer RPE dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Langkah tersebut diulangi. Tabung mikrosentrifus diganti dengan yang baru, disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan membran dari etanol karena adanya etanol dapat menghambat reaksi RT-PCR. Kemudian buang tabung mikrosentrifus bersama dengan supernatan. RNA yang berada di membran spin kolom dilarutkan dengan 20 µl air bebas nuklease dan sentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Langkah tersebut diulangi. Larutan yang berada dalam tabung mikrosentrifus mengandung RNA yang kemudian *dialliqoute* ke dalam *tube* PCR masing-masing 10 µl dan disimpan dalam *deep freezer* -80°C untuk menjaga kualitas RNA (RNeasy Mini Handbook, 2006). Alur kerja ekstraksi total RNA secara skematik dapat dilihat pada gambar 3.3.



Gambar 3.3. Skema Alur Kerja Ekstraksi Total RNA

3.4.6 Analisis Kemurnian Total RNA dengan Spektrofotometer Nanodrop

Sebelum digunakan sebaiknya permukaan optik bagian atas dan bawah dibersihkan dahulu dengan *Kimwipe* yang telah dibasahi dengan aquabidest. Software NanoDrop dibuka dan dipilih modul “Nucleic Acid” lalu dilakukan inisialisasi dengan menempatkan 1 µl air bebas nuklease pada permukaan optik bagian bawah, diturunkan lengan dan diklik “Initialize” pada *software* NanoDrop. Selanjutnya, dilakukan *blank measurement* dengan menempatkan 1 µl air bebas nuklease, ditutup lengan dan diklik “Blank” pada *software* NanoDrop. Setelah selesai, ditempatkan kembali 1 µl sampel RNA pada permukaan optik bagian bawah, ditutup lengan dan diklik “Measure”. Pada pengukuran sampel RNA, perhatikan nilai 260/280. Nilai ini harus menunjukkan 1,8-2,1 untuk menentukan bahwa RNA telah murni (Ausubel, 2001, NanoDrop 2000 Spectrophotometer User’s Manual., 2008).

3.4.7 Analisis SOX2 secara Semi-kuantitatif dengan Menggunakan *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction* dan Elektroforesis Gel Agarose

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

Posisi dan spesifikasi primer gen SOX2 dan PUM1 dapat dilihat pada lampiran. Kondisi RT-PCR diatur sedemikian rupa agar dicapai kondisi optimum.

1. Untuk gen SOX2

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

2. Untuk gen PUM1

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

Kemudian untuk mengkonfirmasi gen dilakukan elektroforesis dengan agarose konsentrasi 1,5%. Sebanyak 4,5 µl larutan hasil RT-PCR ditambahkan dengan 1,5 µl 6x loading dye diatas kertas parafilm. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel. Elektroforesis dinyalakan dan diatur dengan tegangan sebesar 100 volt selama 30 menit. Setelah selesai dijalankan, gel agarose direndam selama 5 menit dalam larutan etidium bromida yang telah diencerkan dengan TBE 1x. Pita-pita ampikon diamati melalui *UV transilluminator* pada panjang gelombang 590 nm dengan pelindung (*hood*) dan difoto dengan kamera digital yang dihubungkan dengan komputer sehingga dapat diedit dan dicetak.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Medium Kultur

Medium kultur merupakan hal esensial yang harus diperhatikan. Sel tidak akan dapat dikultur tanpa adanya medium yang benar. Medium yang dipakai dalam kultur sel fibroblas kanker (CS09K), sel fibroblas normal (BHK), dan sel punca kanker payudara (CSC09K) adalah DMEM *high glucose modified*. Pembuatan larutan blanko DMEM *high glucose* harus memperhatikan kondisi pH karena pertumbuhan sel sangat bergantung pada kondisi keasaman. Larutan blanko DMEM *high glucose* disiapkan dari serbuk DMEM *high glucose* yang dilarutkan dalam air steril dan diberikan indikator fenol merah serta NaHCO_3 sebagai pengadjust pH. Penyiapan medium dilakukan di dalam BSC untuk menjaga sterilitas medium. Setelah dibuat larutan stok 1 L, medium kemudian disaring dengan penyaring bakteri dengan bantuan vakum dan dialliquote ke dalam tabung sentrifus 50 ml.

DMEM *high glucose modified* dibuat dengan cara memipet keluar sebagian medium yang telah dialliquote sampai mencapai volume 42,25 ml. Kemudian ditambahkan ke dalamnya 5 ml *fetal bovine serum* (FBS), 1,25 ml NaHCO_3 , 1 ml HEPES, dan 0,5 ml *penstrep*. Campuran ini kemudian dikocok untuk dihomogenkan dengan pelan dan kemudian disaring dengan penyaring bakteri 0,2 μm . Harus dihindari terbentuknya busa-busa karena dapat menjadi tempat tumbuhnya sumber kontaminasi. Setiap komponen dalam medium kultur memiliki peran yang berbeda. DMEM *high glucose blank* berfungsi sebagai penyedia nutrisi untuk pertumbuhan sel. *Fetal bovine serum* (FBS) berperan untuk meningkatkan perlekatan sel. Konsentrasi FBS yang umumnya dipakai berkisar antara 5-10%. *Penicillin-streptomycin* (*penstrep*) berperan sebagai antimikroba, sedangkan NaHCO_3 dan HEPES berfungsi sebagai dapar. Semua komponen ini akan membentuk satu kesatuan yang menunjang pertumbuhan sel. Medium kultur yang telah dibuat disimpan dalam lemari pendingin 4°C dan dihangatkan sampai suhu 37°C ketika akan digunakan.

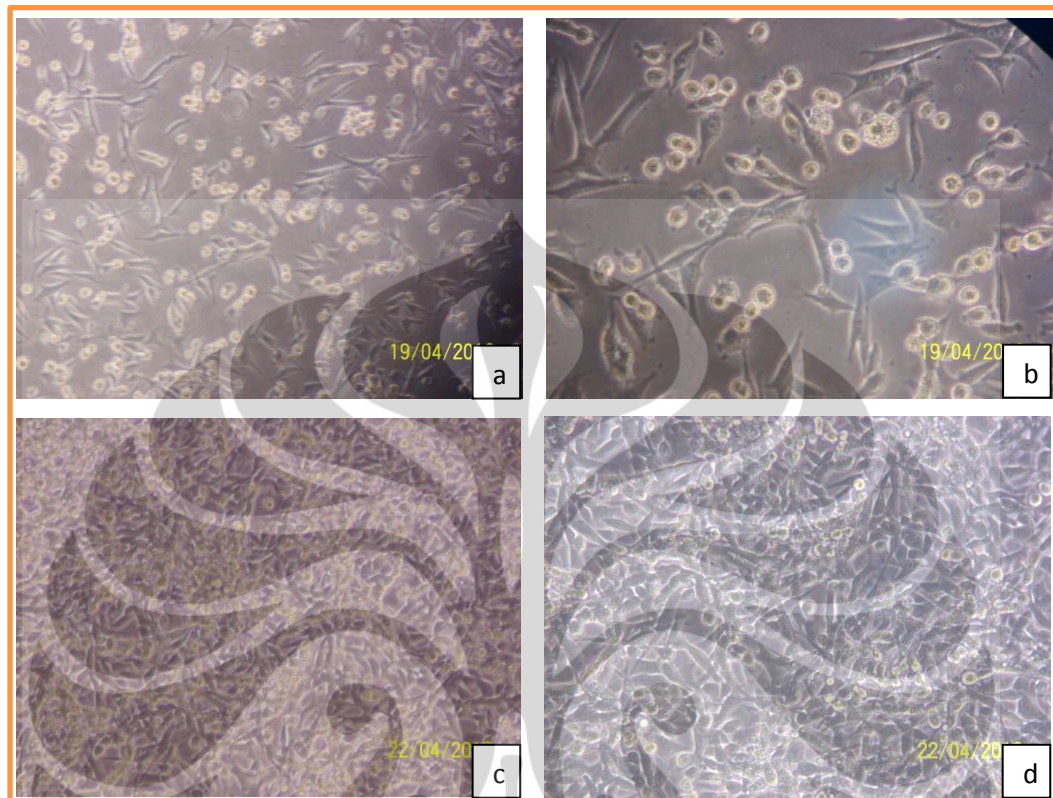
4.2 Kultur Sel CS09K

Sel yang dikultur merupakan sel kanker yang sebelumnya telah diisolasi dari jaringan kanker payudara. Sel kanker CS09K merupakan sel yang diekstraksi dari jaringan kanker payudara dari pasien nomor 9 dari Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) pada tahun 2009. Sel yang diekstraksi tersebut dikultur dan disimpan pada nitrogen cair untuk penyimpanan jangka panjang menggunakan *cryomedium*. *Cryomedium* merupakan medium yang mengandung media kultur, FBS (*fetal bovine serum*), dan DMSO (dimetilsulfonoksida) dengan perbandingan 4 : 5 : 1. DMSO digunakan dalam *cryomedium* untuk mengatur permeabilitas sel.

Pada tahap awal penelitian, kami mengkultur sel kanker CS09K yang diambil dari nitrogen cair *locator V IHVCB-UI*. Suspensi sel yang baru diambil dari nitrogen cair masih beku di dalam *cryotube*. Suspensi sel tersebut dipindahkan ke dalam BSC dengan menggunakan *transfer box*. Setelah mencair, suspensi sel tersebut dipindah ke dalam tabung sentrifus 15 ml dan ditambahkan ke dalamnya 5 ml medium kultur. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan disentrifus pada 300 xg selama 10 menit. Sentifus bertujuan untuk memeleut sel dan mencuci suspensi sel dari DMSO yang bersifat toksik terhadap sel. Umumnya kecepatan yang digunakan berkisar antara 200 - 300 xg. Semakin tinggi kecepatan sentrifus maka akan semakin baik pula pelet sel yang dihasilkan, namun bila kecepatan sentrifus terlalu tinggi, sel akan lisis dan mati. Sel masih dapat mentoleransi kecepatan 300 xg untuk dapat bertahan hidup sehingga kami menggunakan kecepatan 300 xg untuk menghasilkan pelet sel yang lebih baik. Supernatan hasil sentrifus kemudian dibuang dan pelet sel kemudian diresuspensi dalam 7 ml medium dan dikultur pada *flask T-25*.

Pada awal kultur sel dipakai medium DMEM *high glucose* biasa dan tidak dilakukan pencucian DMSO sehingga sel yang dikultur kurang sehat dan pertumbuhannya lambat. Hal tersebut dapat dilihat dari banyaknya debris atau sisa-sisa sel mati pada plat kultur. Sebagai pembanding dilakukan kultur sel lagi dengan menggunakan medium DMEM *high glucose* yang telah kami modifikasi sendiri melalui penambahan NaHCO_3 dan buffer HEPES. Hasil yang didapat dari

medium yang dimodifikasi cukup memuaskan karena sel tumbuh dengan baik dan cepat mencapai konfluensi.



Keterangan : (a) pertumbuhan sel CS09K 50-60% konfluen perbesaran 100x; (b) pertumbuhan sel CS09K 50-60% konfluen perbesaran 400x; (c) pertumbuhan sel CS09K 80-90% konfluen perbesaran 100x; (d) pertumbuhan sel CS09K 80-90% konfluen perbesaran 400x.

Gambar 4.1. Pertumbuhan sel CS09K kanker payudara.

Proses kultur diamati setiap hari karena sel harus dipanen setiap kali sudah mencapai 80-90% konfluen. Bila sel tidak dipanen ketika sudah konfluen, maka akan terjadi fenomena *over-confluent* sehingga sel yang tadinya siap dipanen akan mati dan melayang. Sel ini selanjutnya dipakai sebagai feeder-layer dalam kokultur sel punca sebagai sel kanker. Foto perkembangan sel CS09K dalam 2 jenis perbesaran dapat dilihat pada gambar 4.1.

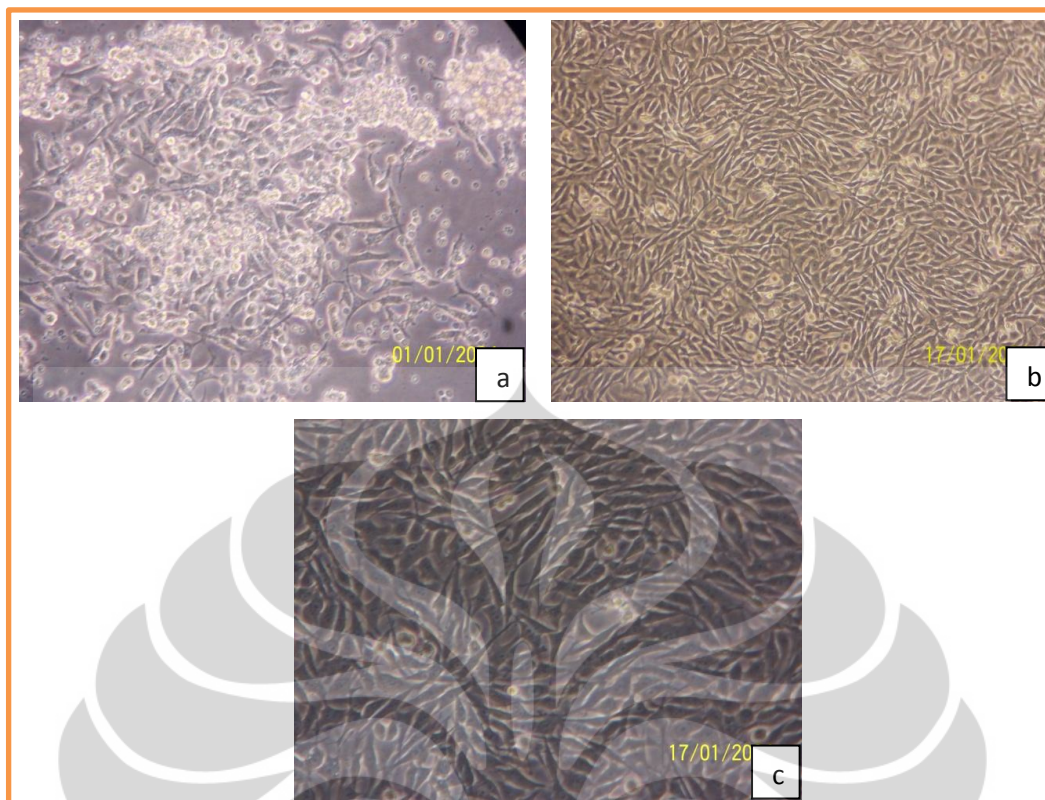
4.3 Kultur Sel Fibroblas Normal BHK (*Baby Hamster Kidney*)

Sel normal yang dipakai dalam penelitian ini merupakan sel fibroblas yang didapatkan dari ginjal bayi hamster. Sel ini juga telah tersedia di IHVCB-UI sebagai *cell-line* yang disimpan dalam nitrogen cair. Perbedaan utama antara *cell line* dan sel biasa terletak pada kemampuan bertumbuhnya; *cell line* mampu bertumbuh terus tanpa mengalami kematian meskipun telah melewati banyak pasase, sedangkan sel biasa akan mengalami kemunduran pertumbuhan dan akhirnya mati pada waktu tertentu. Oleh karena itu, *cell line* disebut juga sebagai *immortal cell*. *Cell line* BHK ini diderivatisasi dari ginjal bayi hamster yang baru dilahirkan sekitar 1-2 hari. Penderivatisasian *cell line* BHK 21 dari ginjal bayi hamster ini memerlukan inisiasi. Inisiasi *cell line* tiap sel berbeda, bahkan dari pabrik yang berbeda saja menggunakan inisiator yang berbeda.

Penyimpanan sel dalam nitrogen cair bisa umumnya memakan cryotube, namun tidak tertutup kemungkinan juga bahwa sel dapat disimpan dalam ampul. Cara pengambilan dan pemindahan ke dalam BSC sama saja seperti yang dilakukan terhadap sel CS09K, hanya saja perlu ketelitian tambahan karena ampul merupakan suatu wadah gelas yang dapat menyebabkan kecelakaan tidak terduga bila meledak karena terjadi perbedaan suhu yang ekstrem.

Pertimbangan dipakainya sel BHK sebagai sel normal dikarenakan tidak dapat bertumbuhnya sel fibroblas payudara normal manusia. Sebagai sel fibroblas normal, sel ini diharapkan mampu memberikan sinyal-sinyal yang sama dengan sel fibroblas normal manusia.

Proses kultur diamati secara seksama setiap hari. Pertumbuhan sel BHK pada awalnya sangat lambat. Dibutuhkan waktu beberapa hari agar sel dapat menempel dan menyebar dan sekitar seminggu untuk dapat konfluen. Setelah itu pertumbuhan sel BHK sangat cepat, secepat pertumbuhan sel CS09K. . Foto perkembangan sel BHK 21 J3 dalam 2 jenis perbesaran dapat dilihat pada gambar 4.2.



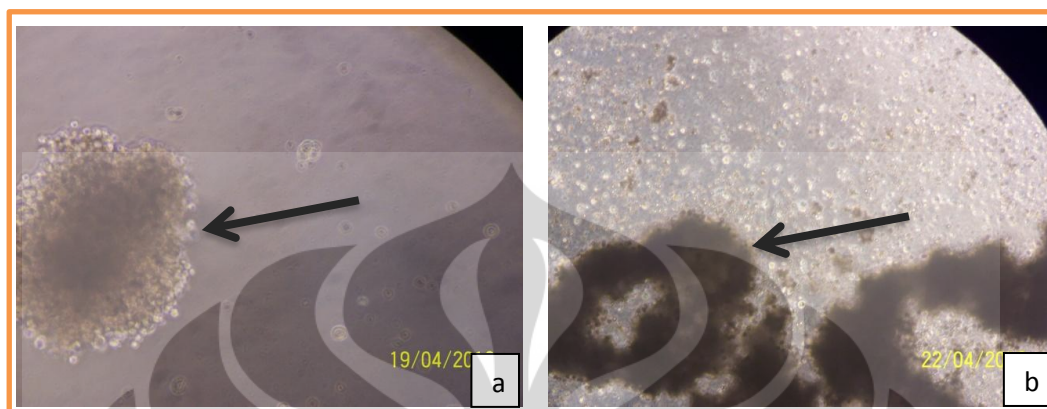
Keterangan : (a) pertumbuhan awal sel BHK perbesaran 100x; (b) pertumbuhan sel BHK 80-90% konfluen perbesaran 100x; (c) pertumbuhan sel BHK 80-90% konfluen perbesaran 400x.

Gambar 4.2. Pertumbuhan sel BHK 21 J3.

4.4 Kultur Sel Punca Kanker

Sel punca kanker merupakan fokus utama kami dalam penelitian ini. Kepluripotensian sel punca kanker sangat erat hubungannya dengan lingkungan sekitarnya. Terdapat dua jenis sel punca kanker yang dapat kami gunakan dalam penelitian ini, yaitu sel punca kanker yang sebelumnya telah diseleksi yaitu sel CD44, dan sel punca kanker yang diambil dari sel CS09K. Seperti yang telah diteliti sebelumnya, sel kanker bersifat heterogen yang artinya terdapat suatu subpopulasi kecil sel yang bukan merupakan sel kanker, melainkan sel punca kanker. Cara memperoleh sel punca kanker dari sel CS09K adalah dengan mengkultur sel CS09K di *microplate 24 well low-attachment*. Wadah kultur ini memiliki suatu lapisan *hydrogel* yang mencegah perlekatan sel, aktivasi enzim, aktivasi selular dan absorpsi protein sehingga sel fibroblas tidak dapat melekat

dan akhirnya mati membentuk suatu gerombolan kehitaman, sedangkan sel punca akan tetap menjadi sel punca tanpa terdiferensiasi (gambar 4.3).



Keterangan : (a) *mammosphere* perbesaran 100x; (b) sel mati yang bergerombol perbesaran 100x.

Gambar 4.3. Pertumbuhan sel punca kanker.

Sel punca yang dipakai dalam penelitian ini adalah sel punca yang diambil dari sel CS09K. Pemilihan sel punca yang akan dipakai dilakukan melalui pengukuran ekspresi $CD44^+/CD24^+$ sebagai penanda permukaan sel punca kanker akan dijelaskan lebih lanjut pada bagian berikutnya. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa sel punca dari sel CS09K (CSC09K) lebih bersifat *stemness* dibandingkan sel CD44 dengan tingkat pertumbuhan yang lebih baik.

Pengulturan sel punca dalam setiap well awalnya dilakukan bervariasi untuk melakukan optimasi pertumbuhan terbaik. Dari kultur didapatkan hasil bahwa pengulturan dengan jumlah sel dibawah atau sebesar 500.000 sel akan menghasilkan pertumbuhan sel punca yang baik, ditandai dengan adanya *mammosphere*. Sel punca yang dikultur pada *microplate low-attachment* ini dipakai untuk penelitian selanjutnya, baik dalam proses kokultur maupun sebagai kontrol.

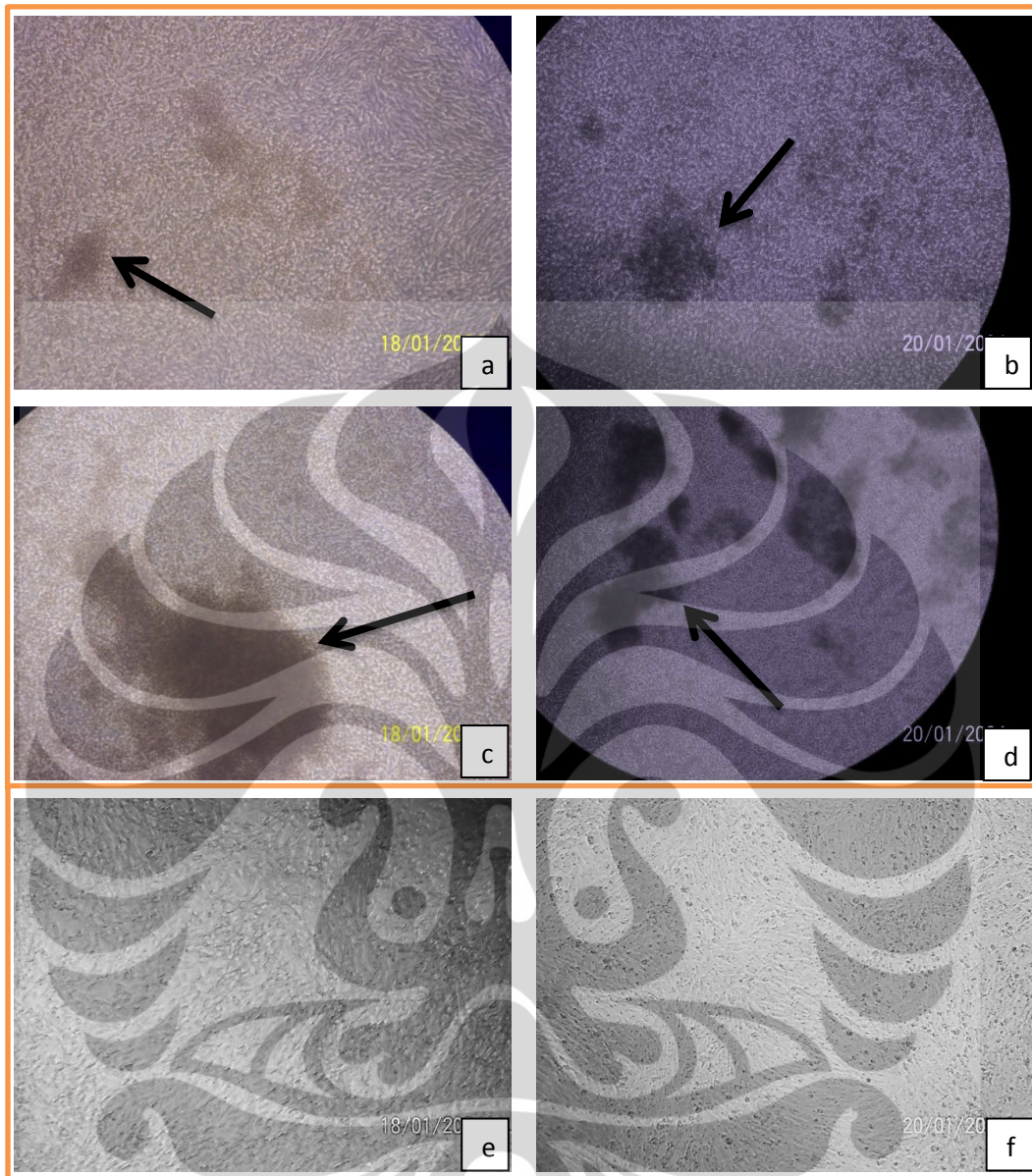
4.5 Ko-kultur Sel Punca Kanker dalam sel CS09K dan sel BHK 21 J3

Tahap ini merupakan inti dari penelitian ini, dimana sel punca kanker dikultur pada *well* yang telah mengandung *feeder layer* yang telah mencapai 70-

80% konfluensi. Awalnya dilakukan percobaan dulu untuk melihat seberapa lama kondisi kokultur dapat dipertahankan, dan didapatkan hasil bahwa kokultur dapat bertahan selama 4 hari karena pada hari ke-5 semua sel melayang akibat fenomena *over-confluent*. Dari hasil itu diputuskan bahwa analisis akan dilakukan pada hari ke-2 dan hari ke-4 kokultur.

Pertama-tama, dilakukan pengulturan sel CS09K dan sel BHK masing-masing sebanyak 4 *well* sebanyak 200.000 sel pada setiap *well*-nya. Setelah 2 hari, sel akan mencapai konfluensi sekitar 70-80% dan siap untuk diko-kultur. Kondisi ini harus dipenuhi agar baik sel normal maupun sel kanker dapat berperan sebagai *feeder layer* yang menghasilkan *niche* atau lingkungan mikro yang dapat memengaruhi pertumbuhan sel punca kanker melalui persinyalannya. Sel punca kanker kemudian dipanen dari *microplate low-attachment*. Jumlah sel punca kanker yang diko-kultur pada sel normal dan sel kanker dalam percobaan ini adalah sebanyak 250.000 sel setiap *well*. Untuk ko-kultur, pertama-tama medium pada setiap *well* dipipet keluar secara perlahan. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir *feeder layer* yang akan terangkat. Kemudian sel punca kanker yang berjumlah 250.000 sel diresuspensi dalam 1 ml medium kultur yang baru dan dimasukkan dalam *well* yang mediumnya telah dikeluarkan tadi. Perlakuan untuk setiap *well* ko-kultur harus sama agar kondisi ko-kultur yang dihasilkan juga sama.

Analisis kepluripotensian sel punca kanker dilakukan pada hari ke-2 dan hari ke-4 ko-kultur. Pada hari ke-2 masih terlihat adanya *mammosphere*, baik pada ko-kultur sel normal maupun sel kanker. Hal ini menunjukkan bahwa sel punca kanker masih memiliki sifat *stemness*. Di sisi lain, pada kontrol sel punca pada *microplate low-attachment*, terlihat bahwa sel punca hampir terdiferensiasi sepenuhnya membentuk sel progenitor. Hal yang serupa terjadi pada hari ke-4, hanya saja terdapat sedikit perbedaan. Pada hari ke-4, *feeder layer* terlihat seakan-akan sudah hilang karena “kaki-kaki” pada sel *feeder layer* sudah hilang. Hal ini terjadi dikarenakan pertumbuhan sel yang sudah sangat tinggi, dimana sudah tidak terdapat celah lagi dalam *well* untuk pertumbuhan sel.



Keterangan : (a) kokultur sel punca kanker dengan sel normal hari ke-2 perbesaran 100x; (b) kokultur sel punca kanker dengan sel normal hari ke-4 perbesaran 100x; (c) kokultur sel punca kanker dengan sel kanker hari ke-2 perbesaran 100x; (d) kokultur sel punca kanker dengan sel kanker hari ke-4 perbesaran 100x; (e) kontrol hari ke-2; (f) kontrol hari ke-4.

Gambar 4.4. Ko-kultur sel punca kanker dengan sel fibroblas normal dan kanker.

Sel punca kanker yang akan dianalisis dipanen dengan menggunakan *collagenase IV*. Enzim ini dapat melepas ikatan antara sel punca kanker dan sel fibroblas sehingga sel punca kanker dapat diangkat menggunakan pipet mikro.

Feeder layer diyakini tidak akan terangkat karena *collagenase* IV tidak cukup kuat untuk melepaskan sel fibroblas dari plate kultur yang melekat kuat. Sel punca kanker ini kemudian dipakai untuk analisis selanjutnya. Perlakuan berbeda dilakukan terhadap kontrol yang ditanam pada *microplate 24 well*. Karena hampir semua sel telah berdiferensiasi, maka sel kontrol dipanen menggunakan tripsin agar sel-selnya bisa terangkat. Foto perkembangan sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker dan normal dapat dilihat pada gambar 4.4.

4.6 Analisis Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ secara Spektrofluorometri

CD44⁺/CD24⁺ merupakan penanda permukaan yang terdapat pada sel punca kanker (Al Hajj et al., 2003). Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ dapat dijadikan sebagai parameter dalam menganalisis kepluripotensian sel punca kanker. Pengukuran sel yang mengekspresikan CD24 dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 488 nm dan emisi 518 nm, sedangkan pengukuran sel yang mengekspresikan CD44 dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 540 nm dan emisi 625 nm.

Sel punca kanker yang telah dipanen diambil sebanyak 25.000 sel untuk tiap perlakuan, dengan perincian 3 perlakuan sebagai sampel dan 1 perlakuan sebagai kontrol dimana antibodi tidak ditambahkan pada kontrol. Tahap awal dari analisis ini merupakan penambahan larutan paraformaldehid 3,7% dengan tujuan untuk fiksasi sel dan menghentikan pertumbuhannya. Setelah itu dilakukan pencucian dengan *blocking buffer*. *Blocking buffer* yang digunakan adalah larutan 1% BSA / PBS. BSA (*Albumin from Bovine Serum*) yang dilarutkan dalam larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) berfungsi untuk mencegah ikatan non-spesifik antara *antibody* dengan antigen lain. Tahap selanjutnya adalah penambahan *antibody* primer *mouse antibody* anti-CD24 dan diinkubasi selama 1 jam. Kemudian hasil inkubasi kembali dicuci dengan *blocking buffer* dan ditambahkan *antibody* sekunder sebagai fluorofor, yaitu FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) dan *antibody* yang satu lagi, yaitu *rabbit antibody* anti-CD44 yang telah dikompleks dengan fluorofor *rhodamine isothiocyanate*. Kemudian perlakuan-perlakuan tersebut diinkubasi lagi selama 1 jam. Setelah diinkubasi, sampel dan kontrol

dicuci dengan *blocking buffer* dan diresuspensikan dalam PBS untuk kemudian diukur dengan spektrofлуorometer.

Sebelum dilakukan pengukuran, alat harus dihidupkan dulu selama setengah jam sampai stabil agar pengukuran yang dilakukan tepat. Selain itu, juga perlu dilakukan *blank* untuk setiap kali pengukuran dengan PBS. Hasil pengukuran ekspresi penanda permukaan CD24 yang dikompleks dengan FITC dan CD44 yang dikompleks dengan *rhodamine* diperlihatkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁺

		FITC		<i>Rhodamine</i>	
		Blanko	Pengukuran	Blanko	Pengukuran
Kontrol hari ke-2	control	3,831	5,451	0,805	1,288
	sample 1	3,707	10,544	0,918	8,553
	sample 2	3,759	9,064	0,901	7,31
	sample 3	3,767	11,338	0,97	8,858
Normal hari ke-2	control	4,08	5,685	0,806	1,313
	sample 1	3,767	10,111	0,941	8,14
	sample 2	3,821	10,116	0,948	7,422
	sample 3	4,035	10,393	0,907	7,726
Kanker hari ke-2	control	3,918	5,544	0,816	1,112
	sample 1	3,824	9,962	0,938	8,341
	sample 2	3,787	11,838	0,927	10,065
	sample 3	3,742	10,447	0,888	9,006
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-2	control	3,73	5,414	0,931	1,064
	sample 1	3,912	10,504	0,803	11,458
	sample 2	3,993	8,929	0,83	9,914
	sample 3	3,917	9,179	0,81	8,301
Kontrol hari ke-4	control	3,653	5,342	0,841	1,237
	sample 1	3,688	7,917	0,984	11,385
	sample 2	3,511	8,156	0,945	10,381
	sample 3	3,516	8,069	0,872	8,738
Normal hari ke-4	control	3,638	5,027	0,808	1,092
	sample 1	3,441	8,793	0,918	10,87
	sample 2	3,652	9,2	0,928	10,746
	sample 3	3,598	7,238	0,894	9,983
Kanker hari ke-4	control	3,794	5,749	0,945	1,083
	sample 1	3,689	8,303	0,849	11,384

	sample 2	3,853	9,828	0,863	13,226
	sample 3	3,846	8,149	0,896	10,22
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-4	control	3,681	5,416	0,941	1,025
	sample 1	3,887	8,033	0,789	12,868
	sample 2	3,958	8,086	0,85	12,736
	sample 3	4,063	8,805	0,775	13,416

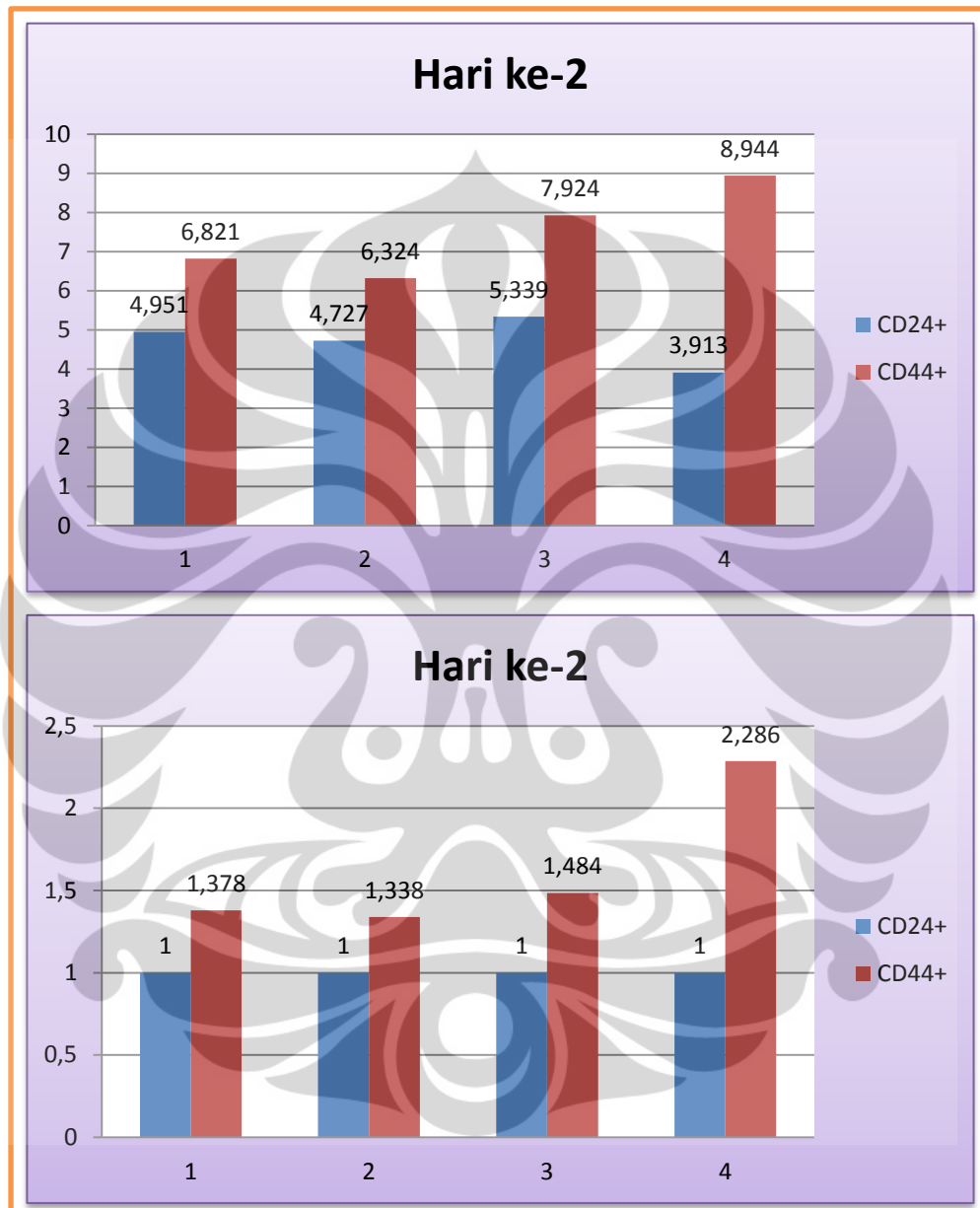
Dari hasil pengukuran tersebut didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 4.2. Hasil pengolahan data ekspresi CD44⁺/CD24⁺

Ekspresi CD44 ⁺ /CD24 ⁺	CD24 ⁺	CD44 ⁺	CD44 ⁺ / CD24 ⁺
Kontrol hari ke-2	4,951	6,821	1,378
Normal hari ke-2	4,727	6,324	1,338
Kanker hari ke-2	5,339	7,924	1,484
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-2	3,913	8,944	2,286
Kontrol hari ke-4	2,787	8,838	3,171
Normal hari ke-4	3,463	9,336	2.696
Kanker hari ke-4	3,176	10,603	3,338
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-4	2,604	12,118	4,654

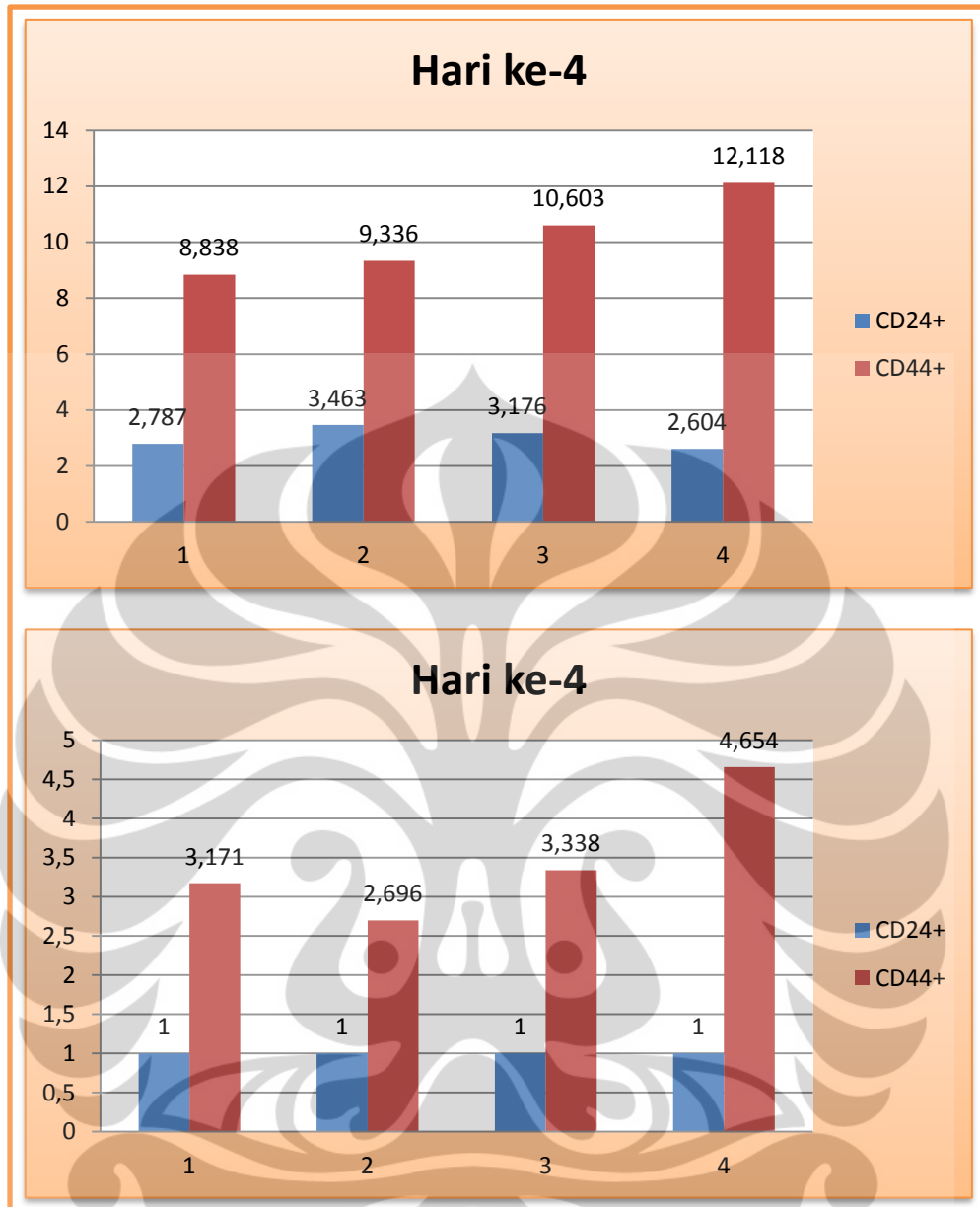
Dari hasil pengukuran didapatkan bahwa ekspresi CD44⁺/CD24⁺ menurun, baik pada kokultur dengan sel normal maupun sel kanker. Hal ini disebabkan karena terjadinya diferensiasi dari sel punca kanker menjadi sel progenitor. Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ pada hari keempat lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresinya pada hari ke-2. Hal ini mungkin disebabkan karena terangkatnya *feeder layer* pada saat pemanenan hari ke-4. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, pada hari ke-4, *feeder layer* mulai kehilangan kemampuannya untuk melekat akibat tingkat pertumbuhannya yang tinggi tidak didukung oleh plat kultur tempat tumbuhnya. Tingginya hasil pengukuran pada hari ke-4 mungkin juga disebabkan ketidakstabilan alat spektrofotometer pada saat pengukuran. Ekspresi CD44⁺/CD24⁺ pada perlakuan yang diko-kultur dengan sel kanker lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang diko-kultur dengan sel normal. Dari sini terlihat bahwa sel kanker menghasilkan lingkungan mikro yang mendukung berkembangnya sel punca kanker serta lebih dapat mempertahankan

kepluripotensian sel punca kanker dibandingkan dengan sel normal. Hasil ini dapat lebih jelas terlihat pada gambar 4.5, gambar 4.6, dan gambar 4.7.



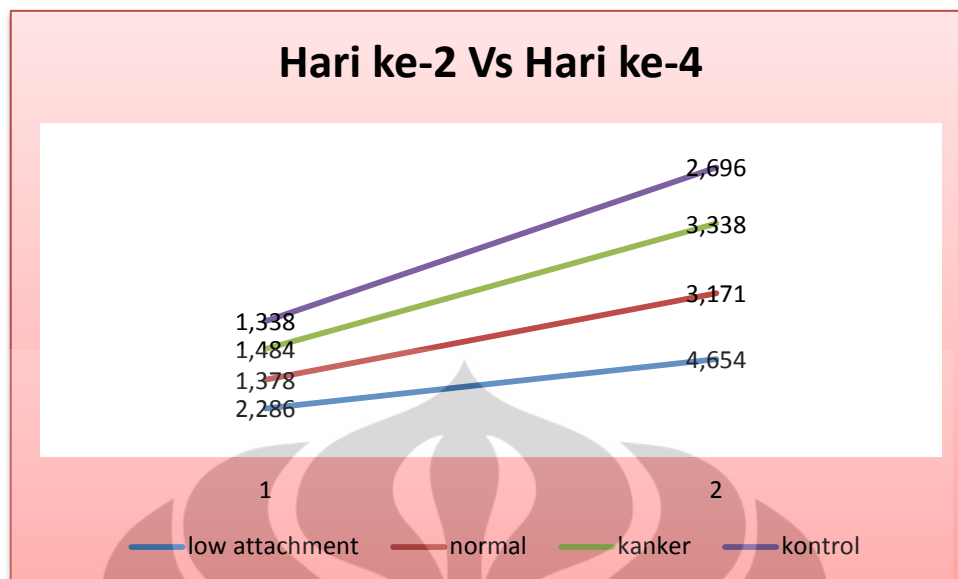
Keterangan : (1) kontrol; (2) ko-kultur dengan sel normal; (3) ko-kultur dengan sel kanker; (4) kontrol sel punca kanker pada *microplate low-attachment*.

Gambar 4.5. Diagram hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁺ hari ke-2.



Keterangan : (1) kontrol; (2) ko-kultur dengan sel normal; (3) ko-kultur dengan sel kanker; (4) kontrol sel punca kanker pada *microplate low-attachment*.

Gambar 4.6. Diagram hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁺ hari ke-4.



Keterangan : (1) pengukuran hari ke-2; (2) pengukuran hari ke-4.

Gambar 4.7. Diagram perbandingan hasil pengukuran ekspresi CD44⁺/CD24⁺ hari ke-2 dan hari ke-4 pada kokultur.

4.7 Ekstraksi Total RNA dan Analisis Kemurnian Total RNA

Pengukuran kepluripotensian sel punca kanker juga dilakukan melalui ekspresi beberapa gen, salah satu yang paling terkenal diantaranya adalah SOX2. Gen ini terlibat dalam pengaturan aktivitas sel punca. Untuk dapat menganalisis ekspresi SOX2 perlu dilakukan ekstraksi asam nukleat dari sel punca kanker berupa RNA.

Dari setiap perlakuan, diambil 150.000 sel untuk ekstraksi total RNA. Penyeragaman jumlah sel sebelum diekstraksi dilakukan sebagai langkah awal dalam normalisasi RNA. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan kit dari Qiagen (RNeasy Mini Handbook, 2006). Sel sebelumnya dipelet dengan disentrifus pada 300 xg selama 10 menit, supernatan yang dihasilkan kemudian dibuang. Pelet sel ditambahkan buffer RLT -yang sebelumnya telah ditambahkan β -merkaptoetanol- sebanyak 350 μ l. Buffer RLT mengandung garam guanidium tiosianat yang berfungsi sebagai pendenaturasi protein yang merupakan komponen penyusun membran sel dengan merangsang transfer *non polar group*

ke dalam air sehingga akan meningkatkan sifat lipofilisitasnya, sedangkan β -merkaptoetanol merupakan agen pereduksi yang efektif dalam menghambat kerja dari Rnase, yaitu suatu enzim yang mendegradasi RNA, dapat bekerja dalam konsentrasi rendah dan sangat stabil. β -merkaptoetanol berkerja dengan cara mereduksi ikatan *disulfide* sehingga akan merusak konformasi enzim RNase dan menjaga keutuhan total RNA (RNeasy Mini Handbook, 2006). Buffer RW1 mengandung guanidium tiosianat dan etanol agar pemecahan sel dan pengendapan materi asam nukleat berlangsung lebih efektif. Penambahan etanol ini bertujuan untuk mengendapkan materi asam nukleat dan menghilangkan kontaminasi protein. Kemudian hasil dari tahap ini dicuci dengan *buffer* RPE sebanyak 2 kali sebagai *washing buffer*. Setelah selesai pencucian kedua, dilakukan penggantian collection tube dan kemudian disentrifus dengan kecepatan penuh selama 1 menit untuk menghilangkan ada kontaminasi dari senyawa lain. RNA kemudian diekstraksi dengan air bebas nuklease. Hasil ekstraksi tersebut kemudian ditambahkan Rnase inhibitor dan *dialiquote*. Fungsi dari *aliquote* ini adalah untuk menyimpan RNA yang belum terpakai pada *freezer* -80°C untuk meminimalisir *freezing-thawing* berlebihan yang dapat menurunkan kualitas RNA. Pengerjaan ekstraksi RNA tidak memerlukan penggunaan BSC, namun sebisa mungkin seluruh bagian kulit dan rambut harus tertutup untuk mencegah adanya kontaminasi Rnase dari tubuh.

RNA yang telah diekstraksi kemudian diukur konsentrasi dan kemurniannya dengan spektrofotometer nanodrop dengan blanko air bebas nuklease. Uji dilakukan pada 2 panjang gelombang, yaitu pada 260 nm dan 280 nm. Hasil pengukuran konsentrasi total RNA dari (a) sel yang diko-kultur dengan sel BHK hari ke-2; (b) sel yang diko-kultur dengan sel CS09K hari ke-2; (c) kontrol hari ke-2; (d) sel yang diko-kultur dengan sel BHK hari ke-4; (e) sel yang diko-kultur dengan sel CS09K hari ke-4; (f) kontrol sel punca kanker dalam *microplate low attachment* berturut-turut adalah 11 ng/ μl ; 4,1 ng/ μl ; 1,4 ng/ μl ; 4,9 ng/ μl ; 13,9 ng/ μl ; 16,1 ng/ μl ; dan 14,9 ng/ μl dengan nilai A260/280 berturut-turut adalah 2,12; 2,26; 1,88; 1,65; 1,87; 1,81; dan 2,05.

Tabel 4.3. Hasil pengukuran konsentrasi RNA

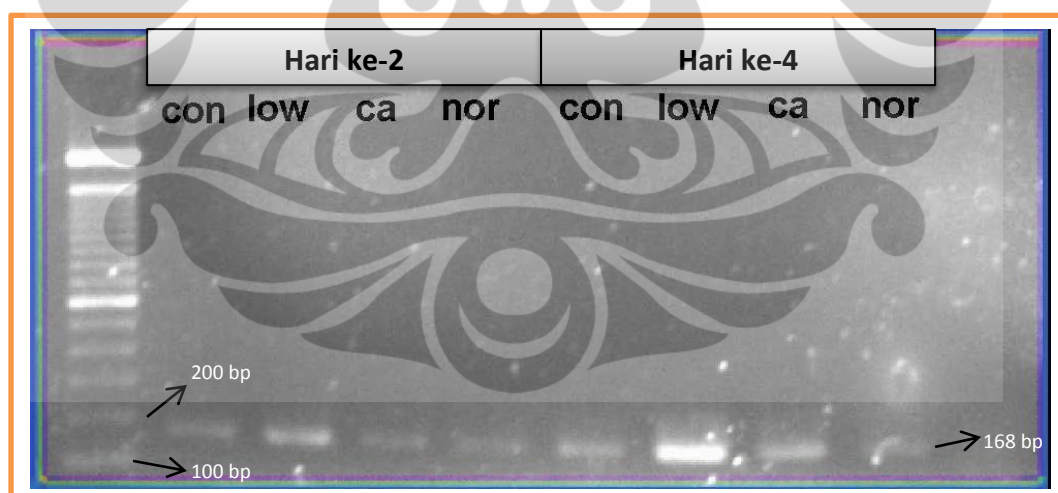
	Perlakuan	Konsentrasi RNA (ng/μl)	Nilai A260/280
a.	Kokultur dengan sel normal hari ke-2	11	2,12
b.	Kokultur dengan sel kanker hari ke-2	4,1	2,26
c.	Kontrol hari ke-2	1,4	1,88
d.	Kokultur dengan sel normal hari ke-4	4,9	1,65
e.	Kokultur dengan sel kanker hari ke-4	13,9	1,87
f.	Kontrol hari ke-4	16,1	1,81
g.	Kontrol sel punca <i>low-attachment</i>	14,9	2,05

Konsentrasi RNA yang rendah diakibatkan karena tidak dipakainya *QIAshredder* yang berfungsi sebagai pengikat sel agar RNA dapat tertarik sempurna. Hal ini disebabkan habisnya kolom *QIAshredder* dari *kit*. Namun, RNA tetap dapat terekstraksi walaupun tanpa kolom tersebut, hanya saja konsentrasinya menjadi lebih kecil. Konsentrasi total RNA sangat kecil pada kontrol hari ke-2 mungkin dikarenakan pemanenan dan ekstraksi baru dilakukan besoknya ketika sel telah mati. Di sisi lain, konsentrasi total RNA pada kontrol hari ke-4 yang tinggi mungkin dikarenakan dipanennya semua sel dengan trypsin. Hal ini dilakukan atas dasar pertimbangan tidak adanya pengaruh dari aspek lain karena semua sel yang berdiferensiasi merupakan sel punca kanker pada awalnya. RNA hasil ekstraksi ini kemudian dipakai untuk analisis selanjutnya dalam pengukuran ekspresi SOX2 dengan RT-PCR.

4.8 Analisis Ekspresi Gen SOX2 Menggunakan *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*

Uji selanjutnya adalah mengukur tingkat ekspresi gen secara semi-kuantitatif dengan menggunakan RT-PCR pada suhu yang didapatkan dari hasil optimasi penelitian sebelumnya. Metode yang digunakan adalah *onestep* RT-PCR dimana hanya digunakan satu jenis enzim dengan 1 suhu perlekatan tanpa gradien. Suhu perlekatan yang digunakan adalah 55°C dengan menggunakan enzim *mix*. Proses transkripsi terbalik dilakukan selama 30 menit pada suhu 50°C.

Sebelum dilakukannya PCR, semua sampel harus dicampur dulu dalam ruang bersih sebelum ditambahkan cetakan DNA dengan konsentrasi yang telah disamakan. Pencampuran dilakukan dengan menggunakan suatu dudukan khusus yang dapat mempertahankan suhu dingin pada temperatur ruang. setelah semua bahan selesai dicampur, penambahan cetakan DNA dilakukan di ruang lain, yakni di ruang BSL-2 (*BioSafety Level 2*) untuk menghindari terjadinya kontaminasi terhadap ruang bersih. Ketika dipindahkan dari ruang bersih, campuran harus tetap dijaga suhunya tetap dingin dengan memakai wadah yang ditambahkan es agar enzim tidak bekerja sebelum dilakukan PCR. Setelah cetakan ditambahkan, maka dimulailah proses RT-PCR di ruang DNA. Proses amplifikasi dilakukan sekitar 39 siklus sesuai dengan hasil optimasi penelitian sebelumnya (Liza Tiara, 2011). Hasil RT-PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarose dengan TAE 0,5x sebagai *running buffer*. Protokol umum menyebutkan bahwa TAE yang dipakai adalah TAE 1x, namun ketika dicoba ternyata TAE 0,5x dapat memberikan hasil yang sama baiknya, sehingga digunakan TAE 0,5x sebagai *running buffer* dalam penelitian ini untuk lebih meringankan biaya penelitian.



Keterangan : (con) kontrol sel punca kanker yang dikultur pada microplate 24 well, (low) kontrol sel punca kanker yang dikultur pada microplate low-attachment, (ca) sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker, (nor) sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal.

Gambar 4.8. Hasil elektroforesis ekspresi gen SOX2.

Penelitian pendahulu menyatakan bahwa SOX2 terkait dengan pluripotensi sel dan mampu menginduksi sel punca kanker dari sel yang telah terdiferensiasi yaitu fibroblast (Takashi et al., 2007). Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen SOX2 menurun baik pada sel yang diko-kultur dengan sel CS09K maupun sel BHK. Hal ini dapat dilihat pada gambar 4.8 dimana pita yang dihasilkan kontrol sel punca kanker payudara microplate low attachment lebih jelas dibandingkan dengan dengan sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal, sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker, maupun kontrol. Dapat dilihat pula adanya perbedaan pita antara sel punca kanker yang dikokultur dengan sel fibroblas kanker dan yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal. Dari hasil elektroforesis ini dapat dikatakan bahwa sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker lebih pluripoten dibandingkan dengan sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal. Hasil ini sejalan dengan hasil spektrofotometri dimana didapatkan hasil bahwa pluripotensi sel punca kanker akan menurun ketika diko-kultur baik dengan sel fibroblas kanker maupun sel fibroblas normal, namun penurunan kepluripotensian sel punca kanker lebih jelas terlihat pada sel punca kanker yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal. Pengamatan secara semi-kuantitatif dapat dilakukan dengan mengamati densitas pita yang dihasilkan (tabel 4.4).

Tabel 4.4. Densitas hasil elektroforesis ekspresi gen SOX2

Perlakuan	Densitas
Kontrol hari ke-2	2207
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-2	2711
Kokultur dengan sel kanker hari ke-2	2366
Kokultur dengan sel normal hari ke-2	2322
Kontrol hari ke-4	2667
Kontrol <i>low-attachment</i> hari ke-4	3344
Kokultur dengan sel kanker hari ke-4	2671
Kokultur dengan sel normal hari ke-4	2438

Hasil yang didapatkan dari metode RT-PCR konvensional ini memperlihatkan ekspresi gen SOX2 secara semi-kuantitatif. Untuk mendapatkan hasil yang kuantitatif dapat digunakan *real time* RT-PCR sehingga didapatkan hasil ekspresi pada setiap siklus amplifikasi. Kondisi untuk *real time* RT-PCR sama dengan RT-PCR konvensional, namun menggunakan berbagai reagen yang berbeda. Pada penelitian kali ini tidak dilakukan pengukuran secara kuantitatif dengan *real time* RT-PCR dikarenakan keterbatasan alat dan waktu. Namun, hasil secara semi-kuantitatif ini juga sudah dapat menggambarkan tingkat peningkatan maupun penurunan ekspresi SOX2 pada berbagai kondisi perlakuan.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Kepluripotensian sel punca kanker payudara menurun pada lingkungan mikro yang dihasilkan baik oleh sel fibroblas kanker maupun sel fibroblas normal.
2. Penurunan kepluripotensian sel punca kanker payudara yang dianalisis dengan metode spektrofotometri dan RT-PCR lebih tinggi pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal dibandingkan dengan yang diko-kultur dengan sel fibroblas kanker.
3. Berkurangnya sifat pluripotensi sel punca kanker payudara akibat pengaruh lingkungan mikro berpotensi dalam pengembangan pengobatan kanker payudara.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan sel fibroblas normal dari jaringan payudara manusia yang normal.
2. Ko-kultur sebaiknya dilakukan pada plat kultur yang lebih besar, baik plat 12 *well*, maupun plat 6 *well* untuk mempertahankan sistem ko-kultur yang lebih baik agar dapat dilakukan pengambilan data dengan rentang yang lebih panjang.
3. Antibodi yang digunakan dalam analisis ekspresi penanda permukaan sel punca kanker payudara secara spektrofotometri sebaiknya berasal dari satu pabrik yang sama dengan konsentrasi awal yang diketahui.
4. Primer yang digunakan dalam penelitian selanjutnya hendaknya dirancang baru dan dipesan segar untuk mendapatkan kualitas dan hasil yang lebih baik karena beberapa primer tidak stabil dan cepat rusak.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell* (Ed. ke-3). New York: Garland Publishing, Inc.
- Al Hajj, M., Wicha M.S., Hernandez A.B., Morrison S.J., dan Clarke M.F. (2003). Prospective Identification of Tumorigenic Breast Cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983–3988.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M. A., Eldor I., J. dan Thomson, J. A. (2000). Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Dev. Biol.* 227, 271–278.
- Application Manual. (1995). Germany: Boehringer Mannheim GmbH Biochemical.
- Azamris, Arif, W., dan Darwin, E. (2003). *Ekspresi CD44 pada jaringan tumor karsinoma payudara*. *Cermin Dunia Kedokteran*, 139, 27–31.
- Bapat, S.A. (2009). *Cancer Stem Cells: Identification and Target*. New York: John Wiley and sons.
- Bolodeoku, J. *PCR Analysis of CD44 Variant in Tumor*. *Methods in Molecular Medicine*, 16, 189.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): Trends and Problem. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23–39.
- Bustin, S.A. dan Nolan, T. (2004). Pitfalls of Quantification Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. *J. Biomol. Techniques.* 15, 3, 155–166.
- Christina H. Stuelten, Stacey DaCosta Byfield, Praveen R. Arany, Tatiana S. Karpova, William G. Stetler-Stevenson and Anita B. Roberts (2005). Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- α and TGF- β . *Journal of Cell Science*
- Dong, C., Wilhelm, D., dan Koopman, P. (2004). SOX Genes and Cancer. *Cytogenet. Genome Res.* 105, 2, 442–447.
- Erlich, H.A. (1989). *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. England: Macmillan Publishers Ltd.
- Fairell, R.E. (2005). *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*. New York: Elsevier Academic Press.

- Franks, F. (1993). *Protein Biotechnology*. US: The Humana Press Inc. Gale, T. (2005). Housekeeping Genes. *Dalam: Gale, Thomas. World of Genetics*. US: Thomas Corporation.
- Gilbert, S.F. (2006). *Developmental Biology* (Ed. ke-8). US: Sinauer Association Inc.
- Horiguchi, K, Toi, M., Horiguchi, S., Sugimoto, M., Naito, Y., Hayashi, Y., Ueno, T., Ohno, S., Funata N., Kuroi, K., Tomita, M. dan Eishi, Y. (2010). Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response. *J Med Dent Sci*; 57 : 165–175.
- Kalluri, R. and Michael Zeisberg (2006). Fibroblasts In Cancer. *Nature Reviews Cancer*; 6 : 392-401.
- Kurnia, A. (2010). *Identifikasi Imunositokimia Sel Punca Kanker Payudara pada Pasien Penderita Kanker Payudara dengan Menggunakan Immunoflourosensi*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Li, X.L. (2004). Expression of the SRY-related HMG Box Protein SOX2 in Human Gastric Carcinoma. *Int. J. Oncol.* 24, 25– 263.
- Lyng, M.B. (2008). Identification of Genes for Normalization of Real-Time RTPCR Data in Breast Carcinomas. *BMC Cancer.* 8, 20.
- Motari, E. E., Zheng, X., Sue, X., Liuc Y., Kvaratskheliad M., Freitas M., Wanga P. G., (2009). Analysis of recombinant CD24 glycans by MALDI-TOFMS reveals prevalence of sialyl-T antigen. *American Journal of Biomedical Science*, 1, 1-11.
- McNeill, R.E., Miller, N., dan Kerin, M.J. (2007). Evaluation and Validation of Candidate Endogenous Control Genes for Real-Time Quantitative PCR Studies of Breast Cancer. *BMC Mol. Biol.* 8, 107.
- NanoDrop 2000 Spectrophotometer User's Manual*. (2008). Delaware: Thermo Fisher Scientific
- National Center of Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698. 5 Pebruari 2012.
- Ornella A. (2010). *Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Qiagen OneStep RT-PCR Kit Handbook*. (2008).US: Qiagen Group.
- Quantity One: User's Guide for Version 4.6.3 Windows and Macintosh*. (2006). California: Biorad Laboratories, Inc.
- Radonic, A., (2004). Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 856–862.

- Revillion, F., (2000). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Expression in Human Breast Cancer. *Eur J. Cancer.* 36, 1038-1042.
- Robyt, J.F. dan White, B.J. (1990). *Biochemical Techniques Theory and Practice.* Illinois: Waveland Press.
- RNeasy Mini Handbook.* (2006). US: Qiagen Group.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., dan Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: Laboratory Manual* (Ed. ke-2). NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Takahashi, K. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 131, 5, 861–872
- Thomson, J.A., Eldor, I., J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. dan Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- 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
- Tiffany M.P., William, H. McBride, Frank, P.. (2006). The Response of CD24-/low/CD44+ Breast Cancer - Initiating Cells to Radiatio. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 24, December 20.
- Tsakamoto, T., Inada, K., Tanaka, H. (2004). "Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia.". *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130 (3): 135–45.
- Vandesompele, J., (2002). Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RTPCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol.* 3, 7, 34.1–34.11.
- Xie, C.Q., Lin, G., Luo, K.L., Luo, S.W., dan Lu, G.X. (2004). Newly Expressed Proteins of Mouse Embryonic fibroblasts Irradiated to be Inactive. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315,581–588.
- Wegner, M. (1999). From Head to Toes: The Multiple Facets of SOX Proteins. *Nucl. Acids Res.* 27, 1409–1420.
- Wilfinger, W.W., Mackey, M., dan Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on The Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques.* 22, 474.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C. D., Carlson M.D., Ambudkar, S.V. dan Varticovski, L. (2008). BRCA1 Breast Tumors Contain Distinct CD44+/CD24- and CD133+ Cells With Cancer Stem Cell Characteristics. *Breast Cancer Res.* 10, 1, R10.

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

Komposisi	Konsentrasi (mg/L)
Asam amino	
Glisin	30
L-Arginin hidroklorida	84
L-Sistein. 2HCl	63
L-Glutamin	584
L-Histidin	42
L-Isoleusin	105
L-Leusin	105
L-Lisin hidroklorida	146
L-Metionin	30
L-Fenilalanin	66
L-Serin	42
L-Treonin	95
L-Triptofan	16
L-Tirosin	104
L-Valine	94
Vitamin	
Kolin Klorida	4
D-kalsium pantotenat	4
Asam folat	4
Niasinamid	4
Piridoksin hidroklorida	4

Riboflavin	0,4
Tiamin hidroklorida	4
i-Inositol	7,2
Garam inorganik	
Feri nitrat	0,1
Magnesium sulfat anhidrat	97,67
Kalium klorida	400
Natrium klorida	6400
Natrium fosfat	125
Komponen lain	
D-glukosa	4500
Fenol merah	15
Natrium piruvat	110

Lampiran 2. 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.



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

Principal Investigator

: Aroem Naroeni, DEA, PhD

Nama Institusi

Name of the Institution

**: Institute of Human Virology and Cancer Biology of
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*

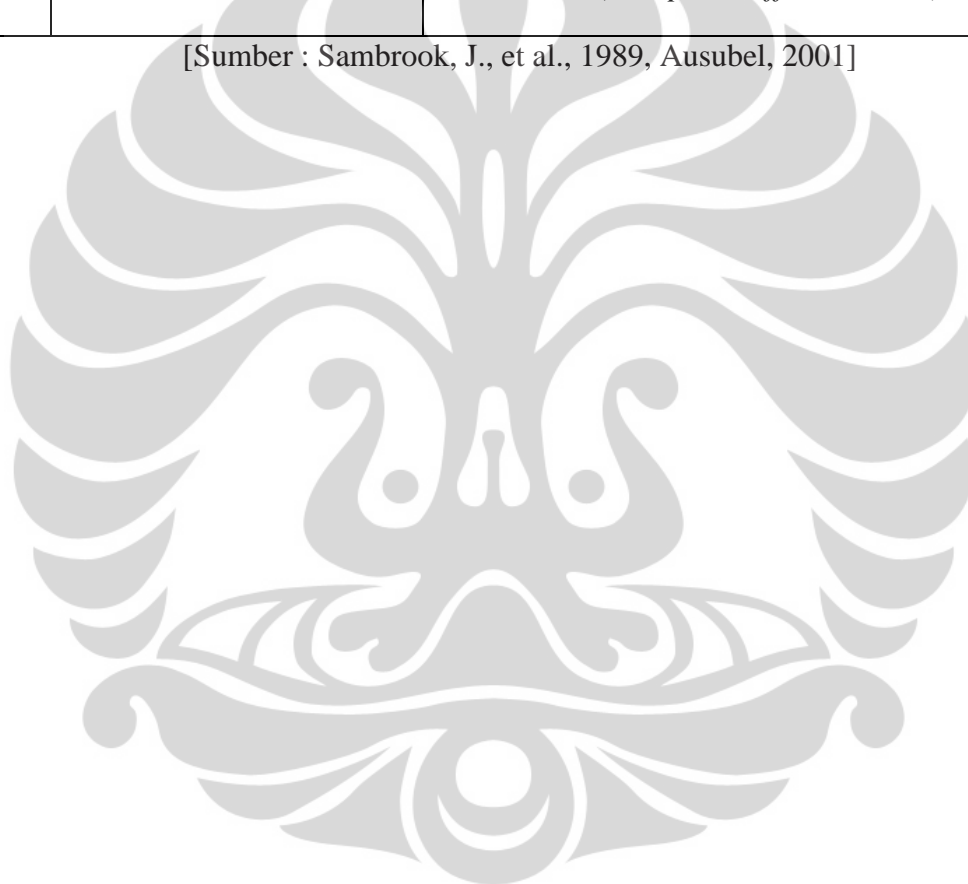
Lampiran 3. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan dalam penelitian

No	Nama Reagen dan Dapar	Cara Pembuatan
1.	Larutan akrilamid 30 %	Sebanyak 29 g akrilamid dan 1 g dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL. Kemudian larutan disaring dengan menggunakan filter Whatman dengan ukuran pori 0,45 mikron dan disimpan dalam botol kaca yang sudah dilapisi dengan alumunium foil dengan suhu penyimpanan 2–4°C.
2.	Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 10 X	Sebanyak 60,55 g tris base, 3,77 Na ₂ EDTA dan 30,92 asam borat dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 200 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ⁰ C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
3.	Dapar TBE (Tris Borat EDTA) 1 X	Sebanyak 50 mL dapar TBE 10 X dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 500 mL. Kemudian larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ⁰ C, tekanan 2 atm, selama 15 menit.
4.	Larutan APS (<i>Ammonium Per Sulfate</i>) 10%	Sebanyak 10 g <i>ammonium per sulfate</i> dilarutkan dalam akuabides hingga tepat 100 mL.
5.	Larutan stok <i>Crystal Violet</i> 1,6 ug/ul	Sebanyak 32 mg <i>Crystal Violet</i> dilarutkan dalam 20 mL akuademineralisata hingga homogen. Larutan disimpan pada suhu ruang.
6.	Larutan gliserol 30 %	Sebanyak 30 mL larutan gliserol 100% ditambahkan akuabides hingga tepat 100 mL.
7.	Larutan EDTA (Etilen Diamin Tetra Acid) 20 mM	Sebanyak 3,7 g Na ₂ EDTA dan 0,4 g NaOH dilarutkan dengan akuabides hingga tepat 20 mL Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 ⁰ C, tekanan 2 atm selama 15 menit.

8.	Larutan loading buffer 6 X	Sebanyak 690 ul larutan gliserol 30%, 125 ul larutan stok Crystal Violet, 80 ul larutan EDTA 20 mM dilarutkan dengan larutan buffer TAE 1x hingga tepat 2 mL. Larutan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 15 menit. Larutan disimpan pada suhu 2–8°C.
9.	Larutan PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) 1 X	Sebanyak 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ dan 0,24 g KH ₂ PO ₄ dilarutkan dalam 800 mL akuabides. Kemudian pH larutan disesuaikan hingga 7,4 dan ditambahkan dengan akuabides hingga 1000 mL.
10.	Larutan Trypan Blue 10 X	Sebanyak 200 mg Trypan Blue dilarutkan dalam PBS hingga tepat 50 mL.
11.	Larutan dNTP <i>mix</i> 10 mM	Sebanyak 5 ul dATP 100 mM, 5 ul dTTP 100 mM, 5 ul dCTP 100 mM dan 5 ul dGTP 100 mM ditambahkan air bebas nuklease hingga volume akhirnya 50 ul. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–4°C.
12.	Larutan RNase Inhibitor	Sebanyak 5 ul larutan stok <i>RNase Inhibitor</i> ditambahkan 5 ul air bebas nuklease. Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–4°C
13.	Larutan Stok Primer SOX2 F 500 uM	Sebanyak 156,4 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–8°C.
14.	Larutan Stok Primer SOX2 R 500 uM	Sebanyak 93,8 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–8°C.

15.	Larutan Stok Primer PUM 1 F 500 uM	Sebanyak 77,6 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–8°C.
16.	Larutan Stok Primer PUM 1 R 500 uM	Sebanyak 54,6 ul dapar TE 1/3 x ditambahkan pada tabung berisi primer yang berbentuk <i>lypholized</i> . Homogenkan dengan pipet dan larutan disimpan pada suhu 2–8°C.
17	Larutan BSA /PBS 1%	BSA (<i>Bovine Serum Albumine</i>) 1 gram dalam 100 ml PBS (<i>Phospate Buffered Saline</i>)

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



Lampiran 4. Komposisi dan perhitungan larutan yang digunakan pada proses
reverse transcription PCR

OneStep RT-PCR [Qiagen] (Anonim, 2008)

No	Komposisi	Volume	Konsentrasi akhir
1	Air bebas nuklease	2,65 μ l	-
2	5x Qiagen OneStep RT-PCR buffer	2 μ l	1x
3	Qsolution	2 μ l	-
4	Primer Forward (20 uM/ul)	0,6 μ l	1,2 μ M
5	Primer Reverse (20 uM/ul)	0,6 μ l	1,2 μ M
6	dNTP mix (masing-masing nukleotida 10 mM)	0,4 μ l	400 μ M
7	MgCl ₂ (25 mM)	0,25 μ l	0,625 mM
8	RNAse Inhibitor (50 unit/ul)	0,1 μ l	-
9	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	0,4 ul	-
10	RNA cetakan	1 μ l	1,4 ng/ μ l
Volume akhir		10 μ l	

Lampiran 5. Posisi dan urutan basa primer SOX2 dan PUM1

No	Nama Primer dan Komposisi Basa	Mulai	Berhenti
1	SOX2 F (NM_003106.3) 5'-CAGCGCATGGACAGTTAC-3' SOX2 R 5'-CATGGAGTTGTA CTGCAGG-3' Panjang amplikon 168	900 1067	917 1049
2	PUM1 F (NM_001020658.1) 5'-TGAGGTGTGCACCATGAAC-3' PUM1 R 5'-CAGAATGTGCTTGCCATAG G-3' Panjang amplikon 187	3416 3602	3434 3583
Score = 36.2 bits (18), Expect = 4e-07 Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%) Strand=Plus/Plus Query 1 CAGCGCATGGACAGTTAC 18 Sbjct 900 CAGCGCATGGACAGTTAC 917		Score = 38.2 bits (19), Expect = 1e-07 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Minus Query 1 CATGGAGTTGTA CTGCAGG 19 Sbjct 1067 CATGGAGTTGTA CTGCAGG 1049	
Score = 38.2 bits (19), Expect = 2e-07 Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%) Strand=Plus/Plus Query 1 TGAGGTGTGCACCATGAAC 19 Sbjct 3416 TGAGGTGTGCACCATGAAC 3434		Score = 40.1 bits (20), Expect = 5e-08 Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%) Strand=Plus/Minus Query 1 CAGAATGTGCTTGCCATAGG 20 Sbjct 3602 CAGAATGTGCTTGCCATAGG 3583	
438 TG TACAACA TGA TGGAGACGGA GCTGAAGCCG CCGGGCCCGC 481 AGCAAAC TTC GGGGGGGCGG GGGGGCAACT CCACCGGGG GCGGGCCGGC GGCAACCAGA 541 AAAACAGCCC GGACCCGTC AAGGGGCCCA TGAATGCTT CATGGTGTGG TCCCGGGGGC 601 AGCGGGSCAA GATGGCCCA GAGAACCCCA AGATGCCAA CTCGGAGATC AGCAAGGGCC 661 TGGCGGCOSA GTGGAAACTT TTCTGGAGA CCGAGAA GCG GCGCTTCATC GACGAGGCTA 721 AGCGGCTGG AGCGGTGCAC ATGAAAGGAC ACCCGGATTA TAAATACCG CCGCGCGGA 781 AAACCAAGAC CCTCATGAAG AAGGATAAGT ACACCTGCC CCGCGGGCTG CTGGCCCCG 841 CCGGCAATAG CATGGCGAG CCGGGTGGGG TGGGGCCCG CCTGGCCCG GCGGTGAACC AGCCATGGA CAGTTAC CCG CACATGAAG GCTGGAGCAA CCGCACTAC AGCATGATGC 961 AGGACCAGCT GGGTACCCG CAGCACCCCG GCTCAATGC GCACGGCACA GCGCAGATGC GGACGTCATGT GAGGTAC 1021 AGCCCATGGA CCGCTACGAC GTGAGGGCC TGGAGTACA CTCCATGACC AGCTCGCAGA 1081 CCTACATGAA CCGCTGCCCC A CCTACAGCA TGCTACTC GCAGCAGGGC ACCCTGGCA 1141 TGGCTTTGG CTCCATGGT TGGGTGGTCA AGTCCGAGCC CACTCCAGC CCCCCTGTG 1201 TTAOCTTCT CTCGCCACTC AGGGCGCCT GCGAGGCGG GGAACCTGGG GACATGATCA 1261 GCATGTATCT CCCCAGGCGC GAGGTGCGGG AACCCGCGC CCCCAGGAGA CTTGACATGT 1321 CCCAGCACTA CAGAGCGGC CCGGTGCCCC GCACGGCCAT TAACGGCACA CTGCCCTCT 1381 CACACATGG A		281 GGCCATGCT TGAAGTGTG GAAAGATCAG AATGGCAATC ACGTGTTCA GAAATGCATT 2941 GAATGTGTAC AGCCCCAGTC TTGCAATTT ATCATC GATG CGTITAAGGG ACAGGATTTT 3001 GCCITATCCA CACATCCTTA TGGCTGCCGA GTGATTGAGA GAATCCTGGA GCACTGTCTC 3061 CCTGACCAGA CACTCCCTAT TTTAGAGGAG CTTCCACAGC ACACAGAGCA GCTTGTACAG 3121 GATCAATATG GAAATTATGT AATCCACAT GTACTGGAGC ACGGTGCTCC TGAGGATAAA 3181 AGCAAAATG TAGCAGAAAT CCGAGGCAAT GTACTTGTAT TGAGTCAGCA CAAATTGCA 3241 AGCAATGTTG TGGAGAAGTG TGTACTCAC GCCTCACGTA CCGAGCGCGC TGTGCTCATC TGACCTGT GCACCATGAA C 3301 GATGAGGTGTGCACCATGAA CCAAGTCCC CACAGTGCCT TATACACCAT GATGAAAGGAC 3361 CAGTATGCCA ACTACGTGT CCAGAAATG ATTGACGTGG CCGAGCCAGG CCAGCGGAAG 3421 ATCGTCATGC ATAAGATCG GCCCCACATC CCAACTCTTC GTAAGTACA G GATACCGTTC C CTATGGCAAG GTGTAAGAC 3481 CACATTCTGG CCAAGCTGGA GAAGTACTAC ATGAAGAAC GTGTTGACTT AGGGCCCATC 3541 TGCATAAGAT CCGGCCCCAC ATCGCAACTC TTCGTAAAGTA CACCTATGGC AAGCACATTC 3601 TGGCCAAAGCT GGAGAAGTAC TACATGAAGA ACGGTGTTGA CTTAGGGCCC ATCTGTGGCC 3661 CCCCTAATGG TATCATCTGA GGCAGTGTCA	

[Sumber: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9698, 28 Mei 2012]

Lampiran 6. Spesifikasi primer SOX2 dan PUM1

EUROGENTEC AIT
ESTABLISHED 1997

Oligo Technical Data Sheet

EUROGENTEC AIT
25 Ayer Rajah Crescent #07-10
Singapore 139944
Tel: +65 6778 6822 Fax: +65 6778 2962
Email: oligos@aitbiotech.com

Customer: Budiman
Address: Indonesia
Order Number: AIT6929
Order Date: 07/08/2009
Remarks:

Oligo Name: Sox2mid-463F
Oligo Number: 55004
5'CAGCGCATGGACAGTTAG3'

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

Oligo Name: Sox2mid-630R
Oligo Number: 55007
5'CATGGAGTTGTA CTGCAGG3'

Delivered:	8 OD	No. Bases:	19	Synthesis Scale:	50 nmole
	278 ug	MW:	5594	Purification:	Desalted
	46.91 nmol	Tm:	45	Delivery Form:	Dry
Conc.:	480ul to 100 uM			Quality Control:	Mald-TOF

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

1st BASE
Your Research. Our Business.

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

Order ID: 86358
PO Number: PTGEN-2056
Report Date: 09-Apr-2010
Total Oligos: 2

Oligonucleotide Datasheet for Ibu Wendrayani

SynthID	Oligo Name	Sequence	Mod	Len	Scale	Purity	Tm(°C)	GC(%)	MW	OD	µg	pmol	To make 100 µM
731132	PUM1F	5'-TGA GGT GTG CAD CAT GGA AC-3'		20	50 nmole	PCR Grade	62.4	55.0	6182	7.6	239.7	38776	add 388µl of dH2O
731133	PUM1R	5'-CAG AAT GTG CTT GCC ATA GG-3'		20	50 nmole	PCR Grade	60.4	50.0	5157	5.3	168.0	27291	add 273µl of dH2O

Mixed Bases Nomenclature

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

Handling Procedures for Oligonucleotides


- It is recommended that oligos be suspended in a sterile buffered solution (i.e. 1xTE at pH8) for longer shelf-life.
- When re-suspending your oligo, vortex them sufficiently but we don't recommend spinning down after re-suspension.
- If your oligo is delivered in wet format, it will be in the concentration (e.g. 100µM) as per your ordering instruction.
- Always aliquot oligo into your working solution to prevent contamination to your stock. Keep oligos in -20°C.

Ordering and Technical Support

Ordering/Enquiries: oligo@base-asia.com
Technical Support: support@base-asia.com
Orders received after 5pm (GMT+8) will be processed the next working day.

Page 1 of 1

Lampiran 8. Sertifikat analisis *Qiagen OneStep RT-PCR*



QIAGEN® Certificate of Analysis

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

Quality Control **Passed**

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

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

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

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

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

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

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

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

dNTP Mix, 10 mM each:
 Spectrophotometric analysis:

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

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

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

Certified by: M. Darius Date: 05/11/10
0409/1 (mm/dd/yy)

Lampiran 9. Gambar alat yang digunakan dalam penelitian.



