



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP APOPTOSIS SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA DENGAN UJI ANNEXIN V
DAN SITOKROM C**

SKRIPSI

**TRIS FEBRIANA CHANTIKA
0806453730**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH LINGKUNGAN MIKRO SEL FIBROBLAS
NORMAL DAN KANKER TERHADAP APOPTOSIS SEL
PUNCA KANKER PAYUDARA DENGAN UJI ANNEXIN V
DAN SITOKROM C**

SKRIPSI

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

**TRIS FEBRIANA CHANTIKA
0806453730**

**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.

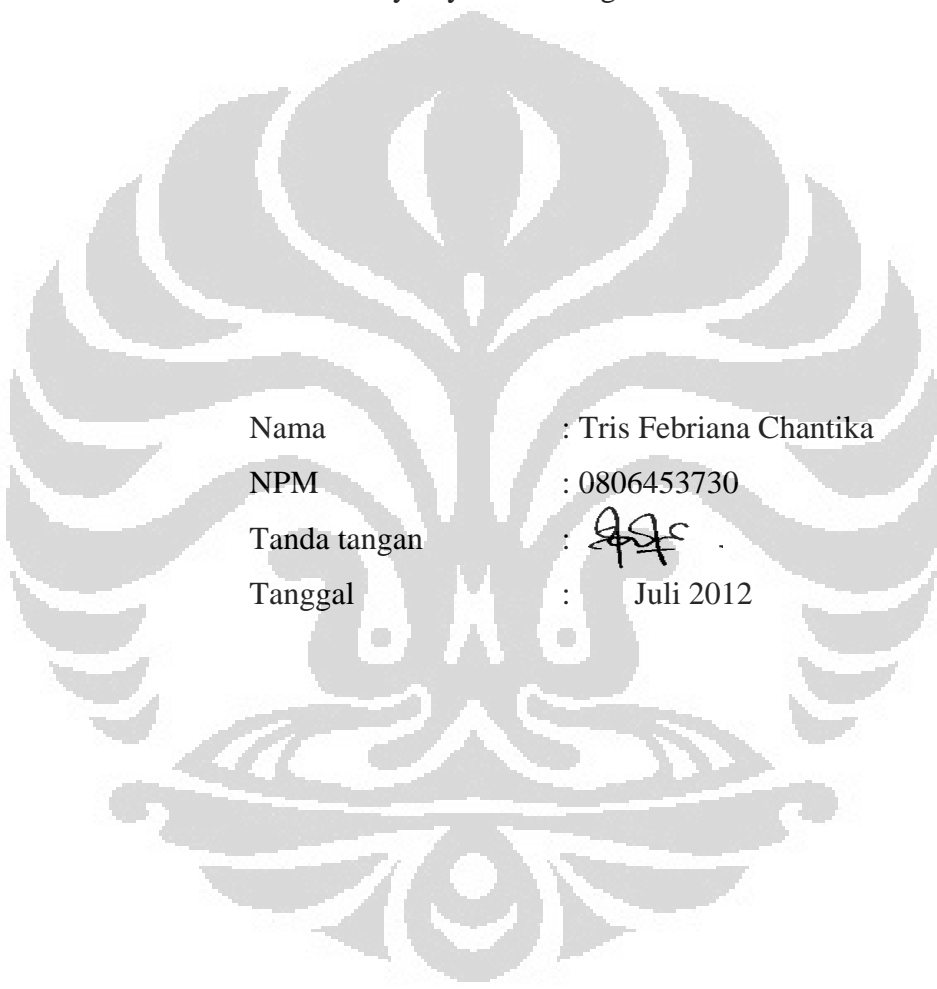
Depok, Juli 2012

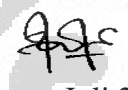


Tris Febriana Chantika

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 : Tris Febriana Chantika
NPM : 0806453730
Tanda tangan :  .
Tanggal : Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Tris Febriana Chantika
NPM : 0806453730
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Apoptosis Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji Annexin V dan Sitokrom *c*

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Amarila Malik, Apt., M.Si. ()

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

Penguji I : Prof. Maksun Radji, M.Biomed. ()

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, M.S., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 17 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas segala berkat dan 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 FMIPA 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. Tuhan Yesus Kristus, yang selalu mendengar doa dan permohonan saya akan skripsi ini. Tanpa rahmat dan pertolonganNya lewat orang-orang sekitar saya mustahil skripsi ini dapat selesai dengan baik adanya.
2. Dr. Amarila Malik, M.Si, selaku pembimbing I, yang telah memberikan waktu, tenaga dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta banyak memberikan bimbingan, ilmu, motivasi, dukungan, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
2. Ibu Aroem Naroeni, DEA., Ph.D, selaku pembimbing II, yang telah memberikan memberikan waktu, pikiran, nasihat, kesabaran luar biasa dan kesempatan untuk melakukan penelitian ini, serta memberikan bimbingan ilmu, motivasi, dan bantuan lainnya yang sangat bermanfaat selama penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Tim Peneliti Unggulan Genom UI 2009-2012 (dr. Budiman Bela, Dr.rer.physiol. dr. Septelia I. Wanadi, drg. Endang W. Bachtiar, PhD, Dr. Amarila Malik, Apt., MSi., Drs. Bambang Wispriyono, Apt., PhD.. dan Aroem Naroeni, DEA., Ph.D) yang telah mempercayai pengerjaan sebagian riset Hibah-UI nya kepada saya.

4. Bapak Dr. Drs. Herman Suryadi M.S., Apt., selaku pembimbing akademis, yang telah memberikan waktu dan nasehat bermanfaat selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Ibu Prof. Yahdiana Harahap, M.S, selaku Kepala Departemen Farmasi UI, yang telah memberikan kesempatan sehingga saya dapat menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Pembina, Ketua Pengurus serta anggota, staf karyawan Laboratorium *Institut of Human Virology and Cancer Biology of the University of Indonesia* (IHVCB-UI), khususnya dr. Fera Ibrahim, M.Sc, Ph.D, SpMK selaku *Director for Science* dan dr. Budiman Bela selaku *Vice Director for Science* IHVCB-UI, dr. Aida Rosita, Kak Kober, Kak Nada, Bu Sofy, Bu Silvi, Kak Go Aulia, dan Mbak Wendra atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian di laboratorium IHVCB-UI.
7. Orang-orang yang saya sayangi, kedua orang tua (Bun Suhardi dan Tjie Pit Fung); kakak (Maria Theresia Ekawati dan Dewi Agustina) serta Wahyu Kuncoro Adhi yang telah memberikan dukungan doa, kasih sayang, didikan, semangat dan motivasi kepada saya selama ini.
8. Sahabat-sahabat saya selama penelitian ini, Michelle, Rudy, Nurul, dan Winnie yang telah berkerja keras bersama dalam suka dan duka untuk menyelesaikan penelitian di IHVCB; sahabat farmasi selama perkuliahan, terutama Yunita, Yiska, Delly, Epin, Seruni, Mawar, serta teman-teman dari KMK FMIPA UI yang telah menyemangati saya dalam perkuliahan dan penyusunan skripsi, dan semua pihak yang telah membantu namun tak dapat saya sebutkan satu persatu.

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 : Tris Febriana Chantika
NPM : 0806453730
Fakultas : Farmasi
Jenis Karya : Skripsi

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

Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Apoptosis Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji Annexin V dan Sitokrom c

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.

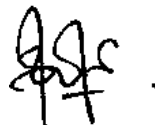
Adapun hak cipta karya ilmiah ini dimiliki oleh *Institute of Human Virology and Cancer Biology of The University of Indonesia* (IHVCB-UI)

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Jakarta

Pada tanggal: Juli 2012

Yang menyatakan



Tris Febriana Chantika

ABSTRAK

Nama : Tris Febriana Chantika
Program Studi : S1 Reguler Farmasi
Judul : Pengaruh Lingkungan Mikro Sel Fibroblas Normal dan Kanker terhadap Apoptosis Sel Punca Kanker Payudara dengan Uji Annexin V dan Sitokrom *c*

Keberadaan sel punca kanker payudara disebut sebagai penyebab resistennya kemoterapi pada penderita kanker payudara. Penelitian dewasa ini menyatakan bahwa lingkungan mikro memegang peranan besar dalam perkembangan tumor. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh lingkungan mikro khususnya fibroblas terhadap apoptosis sel punca kanker payudara. Sel punca kanker payudara diko-kultur dalam fibroblas normal dan fibroblas kanker. Sebagai kontrol ditanam sel punca kanker payudara tanpa adanya *feeder layer* fibroblas normal atau fibroblas kanker. Deteksi apoptosis dilakukan dengan dua metode, metode pertama adalah Annexin V-FITC dilanjutkan dengan analisis mikroskop konvokal dan sitometer, dan metode kedua adalah pengukuran pelepasan sitokrom *c* dengan prinsip *immunoassay*. Hasil penelitian memperlihatkan indeks apoptosis Annexin V dan pelepasan sitokrom *c* pada ko-kultur fibroblas normal lebih tinggi dibanding ko-kultur sel fibroblas kanker. Hasil ini menunjukkan bahwa ada pengaruh lingkungan mikro terutama fibroblas terhadap apoptosis sel punca kanker payudara.

Kata Kunci : annexin V, apoptosis, fibroblas, lingkungan mikro, sel punca kanker, sitokrom *c*
xv + 80 halaman : 11 gambar; 7 tabel; 11 lampiran
Daftar Pustaka : 59 (1987-2011)

ABSTRACT

Name : Tris Febriana Chantika
Program Study: S1 Regular Pharmacy
Title : The Effect of Normal dan Cancer Fibroblast Cell
Microenvironment toward The Apoptosis of Breast Cancer Stem
Cell Using Annexin V and Cytochrome *c* Assay

The presence of breast cancer stem cells had been reported as the cause of chemotherapy resistant in breast cancer patients. Recent studies suggest the role of the microenvironment in tumor progression. This study aims to observe the influence of microenvironment especially fibroblasts to the apoptosis of breast cancer stem cells. Breast cancer stem cells were co-cultured in normal fibroblasts and cancer fibroblasts. As a control, breast cancer stem cells were grown in the absence of normal and cancer fibroblast feeder layer. Apoptosis detection was performed by two methods, first method was Annexin V-FITC followed by confocal microscopy analysis and cytometer, and second method was measuring the release of cytochrome *c* with the principle of immunoassay. Results showed Annexin V apoptosis index and the release of cytochrome *c* in normal fibroblasts co-cultured is higher than cancer fibroblasts co-cultured. These results suggest the influence of microenvironment especially fibroblasts in the apoptosis of breast cancer stem cells.

Keywords : annexin V, apoptosis, cancer stem cell, cytochrome *c*,
fibroblast, microenvironment,
xv + 80 pages : 11 pictures; 7 tables; 11 appendices
Bibliography : 59 (1987-2011)

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
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Anatomi dan Perkembangan Kelenjar Payudara	4
2.2 Kanker Payudara	5
2.3 Sel Punca Kanker Payudara	7
2.4 Matriks Ekstraselular	9
2.5 Apoptosis	11
2.6 Analisis Apoptosis dengan Annexin V-FITC	14
2.6.1 Prinsip Analisis Annexin V-FITC.....	14
2.6.2 Prinsip Fluoresensi	17
2.7 Analisis Apoptosis dengan Pengukuran Sitokrom <i>c</i>	19
3. METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Lokasi Penelitian.....	21
3.2 Perijinan dari Komisi Etik.....	21
3.3 Bahan	21
3.4 Alat.....	22
3.5 Cara Kerja	22
3.5.1 Persiapan Media Kultur Sel DMEM <i>high glucose</i>	23
3.5.2 Proses Kultur Sel	23
3.5.3 Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara dalam Sel Fibroblas Normal dan Kanker	24
3.5.4 Deteksi Apoptosis dengan Annexin V-FITC	25
3.5.4.1 Pembuatan Reagen <i>Buffer Annexin V Incubation dan Binding Buffer</i>	25
3.5.4.2 Prosedur Pelabelan Annexin-V	25
3.5.5 Pengukuran Pelepasan Sitokrom <i>c</i>	26

3.5.5.1	Prosedur Lisis Sel	26
3.5.5.2	Prosedur Uji Sitokrom <i>c</i>	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Persiapan Medium DMEM <i>High Glucose</i>	29
4.2	Proses Kultur Sel.....	29
4.3	Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara	31
4.4	Deteksi Apoptosis dengan Annexin V-FITC	33
4.4.1	Ekspimen Pertama Analisis Annexin V-FITC	34
4.4.1.1	Analisis Annexin V dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i>	34
4.4.1.2	Analisis Annexin V dengan Mikroskop Konvokal.....	38
4.4.2	Ekspimen Kedua Analisis Annexin V-FITC.....	38
4.4.2.1	Analisis Annexin V dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i>	39
4.4.2.2	Analisis Annexin V dengan Mikroskop Konvokal.....	43
4.5	Pengukuran Pelepasan Sitokrom <i>c</i>	45
5.	KESIMPULAN	
5.1	Kesimpulan	50
5.2	Saran.....	50
	DAFTAR ACUAN.....	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 2.1. Anatomi kelenjar payudara.....	4
Gambar 2.2. Dua model untuk penjelasan heterogenitas kanker	8
Gambar 2.3. Jalur intrinsik dan ekstrinsik dari proses apoptosis	14
Gambar 2.4. Skema representatif dari pengikatan Annexin-V terhadap membran sel yang mengalami apoptosis	16
Gambar 2.5. Skema prinsip fluoresensi.....	18
Gambar 3.1. Skema perencanaan penelitian	23
Gambar 3.2. Langkah deteksi apoptosis dengan Annexin V-FITC	26
Gambar 3.3. Langkah deteksi apoptosis dengan pengukuran pelepasan sitokrom <i>c</i>	28
Gambar 4.1. Kultur sel fibroblas normal (kiri) dan kultur sel fibroblas kanker (kanan).....	30
Gambar 4.2. Mamosfer sel punca kanker payudara	31
Gambar 4.3. Pengamatan ko-kultur sel punca kanker payudara pada <i>feeder layer</i> fibroblas normal dan kanker hari kedua dan hari keempat.....	35
Gambar 4.4. Grafik analisis eksperimen pertama Annexin V dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i> fitur program "Apoptosis"	35
Gambar 4.5. Grafik analisis eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i> fitur program "GFP/RFP"	37
Gambar 4.6. Grafik analisis pengukuran apoptosis Annexin V dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i> fitur program "GFP/RFP"	40
Gambar 4.7. Grafik analisis eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i> fitur program "GFP/RFP"	42
Gambar 4.8. Grafik analisis Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal	44
Gambar 4.9. Pengenceran standar sitokrom <i>c</i> untuk pembuatan kurva kalibrasi	46
Gambar 4.10. Kurva kalibrasi standar sitokrom <i>c</i>	47
Gambar 4.11. Grafik hasil analisis sitokrom <i>c</i> pada mamosfer sel punca kanker payudara, kontrol sel punca kanker payudara, ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 4.1. Hasil pengukuran eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan <i>TaliTM Image-Based Cytometer</i> fitur program "Apoptosis"	35
Tabel 4.2. Hasil pengukuran eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan <i>TaliTM Image-Based Cytometer</i> fitur program "GFP/RFP"	36
Tabel 4.3. Hasil pengukuran eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan <i>TaliTM Image-Based Cytometer</i> fitur program "Apoptosis"	40
Tabel 4.4. Hasil pengukuran eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan <i>TaliTM Image-Based Cytometer</i> fitur program "GFP/RFP"	41
Tabel 4.5. Hasil perhitungan fluoresensi sampel sel eksperimen kedua dengan mikroskop konvokal	43
Tabel 4.6. Hasil pengukuran imunoasai standar sitokrom <i>c</i>	47
Tabel 4.7. Hasil pengukuran pelepasan sitokrom <i>c</i> pada mamosfer sel punca kanker payudara, kontrol sel punca kanker payudara, ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Komposisi DMEM (<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i>).....	56
Lampiran 2. Surat perijinan komisi etik.....	57
Lampiran 3. Alat yang dipakai dalam penelitian	59
Lampiran 4. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan	60
Lampiran 5. Foto sampel sel eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal	61
Lampiran 6. Perhitungan analisis Annexin V- FITC dengan sitometer <i>Tali™ Image-Based Cytometer</i> dengan fitur program "GFP/RFP"	73
Lampiran 7. Perhitungan analisis Annexin V- FITC dengan mikroskop konvokal	74
Lampiran 8. Keterangan kit Annexin V-FITC (Trevigen, USA).....	75
Lampiran 9. Keterangan kit <i>Quantikine® Human Cytochrome c immunoassay</i> (R&D System, USA)	77
Lampiran 10. Spesifikasi alat <i>Tali™ Based-Image Cytometer</i>	79
Lampiran 11. Sertifikat analisis alat <i>Tali™ Based-Image Cytometer</i>	80

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan penyakit yang menjadi salah satu penyebab kematian wanita paling tinggi di dunia, dengan lebih dari 1.000.000 kasus baru dan lebih dari 410.000 kematian setiap tahun di seluruh dunia. (Parkin, Bray, Ferlay dan Pisani, 2005). 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). Penyembuhan pada kanker payudara terus dilakukan berdasarkan pengetahuan bahwa seluruh sel kanker tersebut mempunyai potensi keganasan yang sama dan dapat membentuk sel kanker yang baru. Namun, penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hanya sekumpulan kecil sel kanker yang berperan dalam menginisiasi pembentukan sel kanker baru yang disebut sebagai sel punca kanker. Sel punca kanker atau *Cancer Stem Cells* (CSCs) adalah bagian kecil dari seluruh populasi sel kanker yang memiliki karakteristik *self renewal* yang hampir sama dengan sel punca normal (Bapat, 2008).

Keberadaan sel punca kanker pertama kali ditemukan di tumor padat oleh Al Hajj et al., dimana sel punca kanker payudara diidentifikasi di jaringan kanker payudara manusia menggunakan CD44⁺/CD24⁻ sebagai penanda selular (Al Hajj, Wicha, Hernandez, Morrison dan Clarke, 2003). Sel punca kanker adalah subpopulasi kecil sel kanker yang memiliki karakter *stemness* seperti halnya sel punca normal, antara lain *self renewal* dan ketahanan hidup yang tinggi sehingga dapat menyebabkan kekambuhan dan metastasis tumor. Karakteristik pluripotensi yang umumnya dimiliki oleh sel punca juga dimiliki pada jaringan payudara dengan ditemukannya ekspresi gen SOX2 dan c-Myc pada jaringan kanker payudara (Ornella, 2010).

Model sel punca kanker adalah konsep yang menarik untuk dipelajari karena pemahaman ini membantu menjelaskan mengapa ada bagian dari sel kanker yang resisten terhadap kemoterapi (Kai, Arima, Kamiya dan Saya, 2010). Dengan dasar pemahaman akan sel punca kanker, dapat disimpulkan bahwa

pemusnahan sel punca kanker dapat memperbaiki prognosis dari penyakit kanker. Oleh karena itu, karakteristik sel punca kanker payudara harus dipelajari, misalnya mekanisme *cells signaling* dan *tumorigenic pathway* yang ditunjukkan oleh sel punca kanker tersebut.

Lingkungan mikro tumor telah diketahui memegang peranan penting pada pertumbuhan tumor. Tumor padat tidak hanya terdiri dari sel tumor namun mengandung sel stromal yang merupakan lingkungan mikro tumor. Lingkungan mikro ini terdiri dari campuran molekul matriks ekstraseluler (ECM), sel endotel, fibroblas, sel hemopoetik maupun sel imun (Boedina, 2011). *Microenvironment* telah banyak dibahas karena sifatnya yang dapat berfungsi sebagai *tumor suppressor* yang kuat bahkan dengan keberadaan ekspresi onkogen yang kuat, dan sebagai *tumor promotor* untuk pra-kanker (Sternlicht et al., 1999).

Kelenjar payudara terdiri dari sel epitel dan stromal yang berkomunikasi satu sama lain melalui matriks ekstraseluler. Fibroblas bertanggung jawab dalam sintesis dan *remodelling* matriks ekstraseluler dalam lingkungan mikro dan merupakan sumber faktor pertumbuhan yang mempengaruhi proliferasi, pertumbuhan, dan apoptosis sel epitel payudara (Bhowmick, Neilson dan Moses, 2004). Gangguan komunikasi antara sel epitel dan stromal dapat menginduksi dan mempromosikan kanker payudara (Wiseman dan Werb, 2002). Progresi tumor payudara dilaporkan difasilitasi oleh sel stromal dan keberadaan sel tersebut penting untuk kesembuhan sel kanker.

Niche atau lingkungan mikro sel punca juga mempunyai peran pengatur yang penting dalam menjaga fungsi sel punca. Sikap sel punca yang normal (diferensiasi teratur dan pembaruan diri) dan dalam keadaan *quiescent* diatur secara ketat oleh lingkungan mikro sel punca. Lingkungan mikro *niche* juga mengontrol perbaikan kerusakan sel punca yang dapat memicu terjadinya kanker. Hal ini didasari pada fakta bahwa banyak tumor yang hidup dorman atau berkembang secara perlahan sebelum menimbulkan gejala klinis (Bisell dan LaBarge, 2005).

Pada penelitian kali ini akan dilihat peran lingkungan mikro terhadap sel punca kanker payudara dengan melakukan ko-kultur sel punca kanker payudara ke sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker, terutama bagaimana lingkungan

Universitas Indonesia

mikro dapat mempengaruhi keadaan apoptosis sel punca kanker payudara. Metode pengamatan apoptosis dilakukan dengan dua cara yaitu dengan pelabelan Annexin V-FITC yang dianalisis dengan sitometer *Tali™ Based Image* dan mikroskop konvokal serta pengukuran pelepasan sitokrom *c* dengan *immunoassay*.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh lingkungan mikro terhadap apoptosis sel punca kanker payudara dengan ko-kultur dalam sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker.

1.3 Manfaat Penelitian

Ko-kultur sel punca kanker payudara pada matriks ekstraselular yang dihasilkan oleh sel fibroblas diharapkan dapat memberikan petunjuk akan pengaruh lingkungan mikro terhadap sel punca kanker payudara sehingga dapat memberikan alternatif terapi kanker payudara yang lebih baik daripada terapi konvensional.

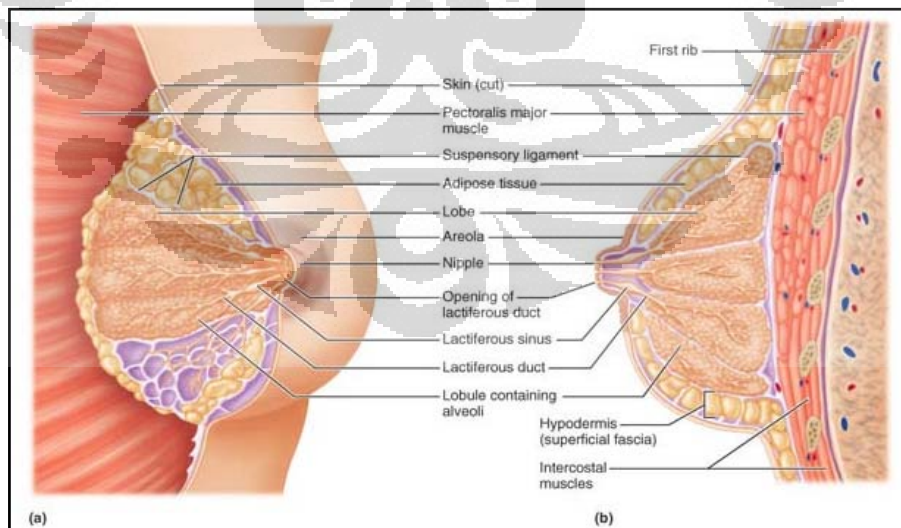
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi dan Perkembangan Kelenjar Payudara

Kelenjar payudara merupakan kelenjar yang berkembang dari kelenjar keringat yang telah termodifikasi. 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 kelenjar payudara terdiri dari 15–25 lobus dan dipisahkan satu sama lain dengan jaringan penghubung fibrous dan lemak. Di dalam lobus terdapat unit yang lebih kecil yaitu lobulus yang mengandung *glandular alveoli*. Tugas dari *glandular alveoli* adalah memproduksi susu ketika proses laktasi lewat saluran *lactiferous ducts* yang terhubung ke puting. Setiap saluran *lactiferous ducts* mempunyai bagian yang lebih besar yang terletak di belakang areola yaitu *lactiferous sinus* yang berfungsi untuk tempat akumulasi susu ketika wanita menyusui (Elaine dan Katja, 2010).

Selama laktasi, susu diproduksi dari sel epitel luminal yang dikelilingi oleh sel mioepitel yang mensintesis *basement membran* dan membentuk duktus. Tipe sel lain yang berfungsi untuk mengatur homeostasis mengelilingi duktus, antara lain fibroblas, leukosit dan sel endotel (Kanojia dan Chen, 2011).



[Sumber : Elaine dan Katja, 2010]

Gambar 2.1. Anatomi kelenjar payudara

(a): Bagian interior dari payudara (b): Potongan membujur dari payudara

Klasifikasi sel somatik atau kanker secara umum biasanya didasarkan pada pengetahuan akan tahapan *immature* sel seperti perkembangannya dalam bentuk fetus. Tahapan pertama dalam perkembangan payudara manusia pada janin adalah tahapan *primary bud*. Pada tahap ini, payudara yang berasal dari sel epitel akan muncul minggu ke-14 kehamilan. Ada dua tipe sel yang dapat diidentifikasi yaitu sel *primary bud* sentral dan perifer (basal). Beberapa minggu selanjutnya, bagian tertentu dari sel epitel yang disebut *secondary epithelial outgrowth* bermigrasi dari *primary bud* yang sedang berkembang ke jaringan mesenkim, yang nantinya akan bercabang dan berkanal dengan akhir saluran membentuk bulatan seperti lobul (Petersen dan Polyak, 2010).

Sampai puberitas, kelenjar payudara tetap *immature* dan terdiri dari saluran (*ductus*) yang bercabang tunggal atau beberapa (*side branching*). Ketika puberitas, kelenjar payudara membesar diikuti pula oleh bervariasinya saluran *ductus*. Perubahan juga terjadi pada ujung *ductus* yang membesar dan membentuk struktur tertentu yang disebut *terminal end bud* (TEB). TEB adalah bagian yang pertama kali berproliferasi, dan meluas menjadi jaringan lemak (Wiseman dan Werb, 2002).

Perkembangan selanjutnya dapat diamati pada masa kehamilan dan laktasi. Hormon reproduksi merangsang ekspansi dan diferensiasi terminal dari epitel kelenjar payudara menjadi *lobular alveoli*. Ketika proses laktasi tidak berlangsung dalam kurun waktu yang lama, *glandular alveoli* mengalami apoptosis dan sel lemak mengalami rediferensiasi. Proses ini dikenal sebagai involusi (Petersen dan Polyak, 2010; Wiseman dan Werb, 2002).

2.2 Kanker Payudara

Kanker adalah sel abnormal yang tumbuh dan cenderung menginvasi jaringan lain dan menyebar ke bagian tubuh lain. Peristiwa terjadinya kanker ditandai dengan proliferasi selular yang tidak terkontrol dan inaktivasi gen yang tumbuh normal. Selanjutnya sel akan terus mengalami pembelahan dan tidak mengenal apoptosis. Karakteristik sel kanker yang disebut autonomi merujuk pada

Universitas Indonesia

keadaan ketika sel menjadi independen dalam mengatur kontrol signal pertumbuhan dan pembelahan seluler (Corwin, 2008).

Kanker payudara merupakan penyakit berbahaya yang umum terjadi pada wanita dan tertinggi kedua kanker penyebab kematian pada wanita. Kanker payudara dikategorikan berdasarkan pola unik dari ekspresi gen yang ditemukan, yaitu luminal A, luminal B, *basal-like*, ERBB2+ dan *normal breast-like* (Kai, Arima, Kamiya dan Saya, 2010). Sekitar 10% dari kanker payudara terjadi karena keturunan dan setengahnya dapat dideteksi dari mutasi sejumlah gen yang disebut *BRCA1* dan *BRCA2*. Gen ini bertanggung jawab akan timbulnya kanker payudara. Mutasi *BRCA1* dihubungkan dengan insiden tinggi pada perkembangan penyakit kanker payudara dengan resiko sebesar 82%. *BRCA1* mengalami mutasi pada 2,5% - 5% dari semua kanker payudara, 45% pada keluarga yang mewarisi kanker payudara, dan lebih dari 80% pada keluarga kanker payudara atau ovarium (Wright, Calcagno, Salcido, Carlson, Ambudkar dan Varticovski, 2008).

Faktor resiko yang diketahui dapat menjadi penyebab kanker payudara antara lain adalah (1) onset menstruasi yang terlalu cepat dan menopause yang datang terlambat; (2) tidak mengalami kehamilan atau hanya sekali mengalami kehamilan dan tidak menyusui atau menyusui dalam jangka waktu yang singkat; (3) silsilah keluarga yang mempunyai riwayat kanker payudara; dan (4) pengantian estrogen – progesteron pada keadaan setelah menopause (Elaine dan Katja, 2010).

Manifestasi kanker payudara ada di epitel payudara, dan baru-baru ini dipercaya bahwa sel stromal payudara juga mempunyai peran penting dalam tumorigenesis (Wiseman dan Werb, 2002). Kanker payudara biasanya muncul dari sel epitel *ductus* yang paling kecil, bukan dari alveoli. Tidak ditemukan sel mioepitel pada kanker payudara, sehingga nantinya sel tumor akan berkontak langsung dengan sel stroma yang meliputi sel fibroblas, miofibroblas, pembuluh darah dan sel imun seperti limfosit, makrofag dan sel mast (Jessen dan Bisell, 2009). Kluster kecil dari sel kanker akan berkembang menjadi benjolan pada payudara. Penyebab pasti akan asal unsur kanker payudara sedang diteliti, namun telah banyak hipotesis yang dibuat untuk menjelaskan hal tersebut.

Universitas Indonesia

Kanker payudara biasanya ditandai dengan adanya tonjolan pada payudara dan perubahan tekstur kulit, pengerutan atau keluarnya cairan dari puting. Pemeriksaan akan kanker payudara dapat dilakukan individu dengan memeriksa apakah ada tonjolan di payudara secara rutin. *American Cancer Society* merekomendasikan pemeriksaan X-ray mamografi secara berkala yang dapat mendeteksi kanker payudara yang terlalu kecil sehingga tidak dapat terasa setiap 2 tahun sekali untuk wanita antara 40 – 49 tahun dan setiap 1 tahun sekali untuk wanita di atas 49 tahun.

Setelah didiagnosis, kanker payudara ditangani dengan berbagai cara tergantung dengan karakteristik spesifik dari lesi yang tampak. Terapi untuk kanker payudara dapat berupa terapi radiasi, kemoterapi, atau operasi yang umumnya diikuti dengan iradiasi atau kemoterapi untuk menghancurkan sel kanker yang belum terangkat.

2.3 Sel Punca Kanker Payudara

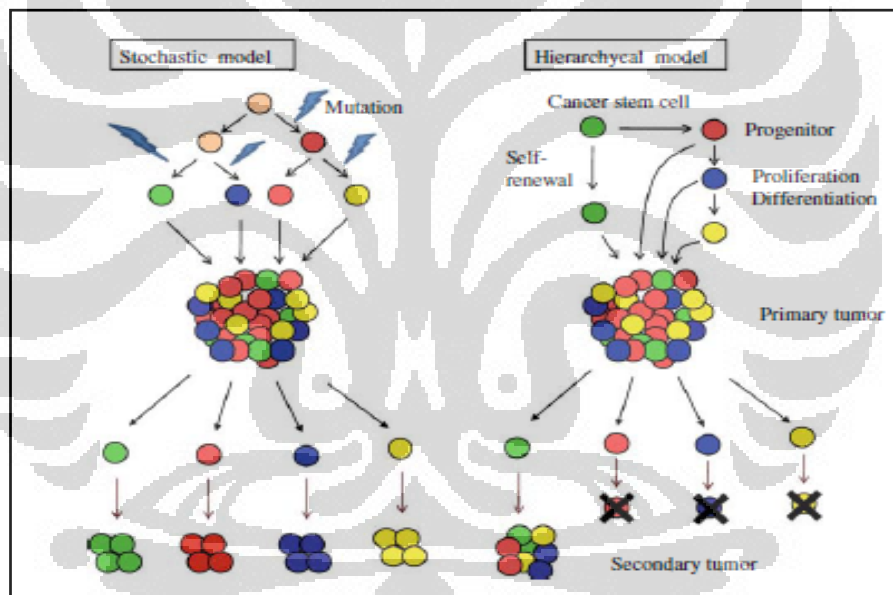
Sampai pada awal 1990, kanker dianggap sebagai massa dari sejumlah sel, dimana semua sel mempunyai peluang untuk berproliferasi dan menginisiasi kanker. Namun, seiring dengan penelitian sel punca leukemia yang dilakukan oleh Dick et al., timbul pemahaman baru bahwa tumor ganas mempunyai dua subpopulasi sel yang berbeda, yaitu sel yang dalam jumlah kecil dapat meregenerasi kerusakan sel (sel punca kanker) dan sel lainnya yang kehilangan aktivitas pertumbuhan sebagai konsekuensi dari diferensiasi dan penuaan (Kai, Arima, Kamiya dan Saya, 2009). Menurut hipotesis ini, kanker berasal dari sel punca jaringan atau sel progenitor, dan hanya fraksi kecil dari sel tersebut, yaitu sel punca kanker, yang mempunyai kemampuan melakukan proliferasi (Bonnet dan Dick, 1997; Lobo, Shimono, Qian dan Clarke, 2007).

Sejumlah teori disusun untuk menjelaskan asal usul dari sel punca kanker. Teori pertama menyebutkan bahwa sel punca kanker dapat berasal dari perubahan genetik atau epigenetik dari sel punca normal atau dari sel progenitor. Kedua, sel punca kanker dapat berasal dari sel tumor somatik yang mengalami dediferensiasi atau *reprogramming* menjadi mirip sel punca (Visvader dan Lindeman, 2008).

Universitas Indonesia

Ketiga, baru-baru ini ditemukan bahwa sel punca kanker dapat berkembang dari non-sel punca kanker melalui produksi molekul yang disekresi (Iliopoulos, Hirsch, Wang dan Struhl, 2011).

Sel punca kanker dikenal memiliki kemampuan untuk melakukan pembaruan diri tidak terkontrol dan potensi diferensiasi yang abnormal secara simetrik dan asimetrik (Signore, Ricci dan Maria, 2011). Karena itu, hipotesis sel punca kanker dapat menjelaskan heterogenitas kanker sebagai struktur hirarki yang disusun dari tahapan diferensiasi sel-sel yang beragam. Selain itu, sel punca kanker memiliki kemampuan metastatis ke organ dan jaringan lain serta resisten terhadap apoptosis seperti layaknya sel punca somatik (Domen, Cheshier dan Weissman, 2000).



[Sumber : Kai, Arima, Kamiya dan Saya, 2010]

Gambar 2.2. Dua model untuk penjelasan heterogenitas kanker

Untuk penargetan sel punca kanker, sistem identifikasi dan evaluasi aktivitas sel punca kanker di jaringan tumor harus dikembangkan. Penanda permukaan sel dan deteksi aktivitas enzim dengan *Fluorescence-Activated Cell Sortor* (FACS) telah banyak digunakan untuk keperluan isolasi sel punca kanker. Pada kanker payudara, ditemukan subpopulasi $CD24^{-}/CD44^{+}$ pada permukaan sel

Universitas Indonesia

punca kanker payudara (Al Hajj, 2003). 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, Calcagno, Salcido, Carlson, Ambudkar dan Varticovski, 2008).

Meskipun sel punca $CD44^+/CD24^-$ dan $CD133^+$ diduga berbeda asalnya, namun kedua populasi sel punca kanker tersebut mengekspresikan gen *stemness* yang sama yaitu *Oct4*, *Noct1*, *ALDH1*, *Fgfr1* dan *Sox1* (Ginestier, 2007). Ekspresi gen tersebut diketahui menginduksikan pembentukan sel punca dari sel-sel yang terdiferensiasi seperti fibroblas yang disebut *Induced Pluripotent Stem Cell* (iPS) (Takahashi, 2007).

2.4 Matriks Ekstraselular

Formasi, fungsi dan regenerasi jaringan setelah ada kerusakan adalah hasil dari interaksi sejumlah proses sel, dimana setiap proses tersebut diinduksi oleh hantaran sinyal yang berasal dari lingkungan ekstraselular (*extracellular environment*). Lingkungan ekstraselular, yang mengelilingi setiap sel dan menghasilkan sinyal molekular, mempunyai tiga efektor yang penting: (1) molekul matriks alami yang tidak larut (kolagen, laminin, elastin dan fibronectin), (2) makromolekul yang larut (*growth factor*, *chemokines* dan *cytokines*) dan (3) protein permukaan sel tetangga (*cadherins*) (Haque, Nagaoka, Hexig dan Akaike, 2010).

Sebanyak 80% volume kelenjar payudara terdiri dari bagian stroma payudara. Stroma tidak hanya memodulasi perkembangan normal dari kelenjar payudara namun secara aktif juga berpartisipasi dalam transformasi jaringan kelenjar payudara (Kass, Erler, Micah dan Valerie, 2007). Walaupun secara garis besar sel epitel kelenjar payudara yang mengalami proliferasi, namun diyakini bahwa stroma kelenjar payudara juga berkontribusi pada sinyal instruktif dan permisif dalam perkembangan payudara (Wiseman dan Werb, 2002). Stroma atau kerangka pendukung dari lapisan epitel terdiri dari fibroblas, sel endotel, sel otot polos, adiposa, sel inflamasi, sel saraf dan jaringan makromolekular dari

Universitas Indonesia

proteoglikan dan glikoprotein yang disebut dengan matriks ekstraselular (Shekhar, Pauley dan Heppner, 2003).

Fibroblas adalah mayoritas tipe sel pada komponen stroma yang terlibat secara khusus dalam dialog stromal-epitelium saat jaringan mengalami homeostasis. Fibroblas merupakan sel yang paling umum ditemui di jaringan penghubung pada manusia. Fungsi utama fibroblas adalah untuk mengatur integritas struktural dari jaringan penghubung dengan mensekresi prekursor matriks ekstraselular secara simultan. Fibroblas membuat kolagen, glikosaminoglikan, fiber retikular dan elastik, dan glikoprotein yang ditemukan di matriks ekstraselular (Shekhar, Pauley dan Heppner, Gloria., 2003).

Perubahan pada fibroblas stromal telah diteliti dapat menimbulkan tumor. Perubahan yang dapat terjadi meliputi perubahan dalam karakteristik pertumbuhan dan potensi migrasi, dan perubahan ekspresi dari faktor pertumbuhan seperti *platelet-derived growth factor*, *insulin-like growth factor I* dan *insulin-like growth factor II*, *transforming growth factor beta*, *hepatocyte growth factor* dan *keratinocyte growth factor* (Shekhar, Pauley dan Heppner, 2003). Kebanyakan dari faktor-faktor ini bertugas dalam stimulasi proliferasi dan dapat berperan dalam menginisiasi proses karsinogenik (Bhowmick, Neilson, dan Moses, 2004).

Secara struktural, matriks ekstraselular merupakan gel yang terdiri dari serat protein yang bervariasi (fibril) yang terhubung dengan rantai glikosaminoglikan. Fungsi dari matriks ekstraselular secara umum adalah sebagai bagian yang mendukung dan menopang sel dan jaringan secara mekanik, menyatukan sel dan jaringan, dan mengkoordinasi fungsi sel melalui sinyal-sinyal khusus dengan reseptor adhesi sel. Secara garis besar matriks ekstraselular tersusun atas serat (*fibers*), proteoglikan, dan glikoprotein adhesif (Hinz, 2007).

Telah lama diketahui bahwa matriks ekstraselular dibutuhkan pada fungsi normal diferensiasi sel epitel payudara. Pada kelenjar payudara, struktural dan komposisi molekular matriks ekstraselular berubah mulai dari anak-anak, dewasa, hamil, laktasi dan involusi. Perubahan bentuk matriks ekstraselular ada pada *basement membrane*, yang memisahkan sel epitel luminal dan basal dari jaringan

Universitas Indonesia

mesenkim. Perubahan paling mencolok pada *basement membrane* adalah selama involusi ketika protease matriks ekstraselular merusak *basement membrane* dengan diikuti apoptosis dan hilangnya fungsi pengeluaran susu (Lochter dan Bisell, 1995).

Sel punca normal berada dalam lingkungan tertentu yang disebut *stem cell niche*. Lingkungan ini terdiri dari komposisi rumit dari matriks ekstraselular, *soluble factor*, sel stromal dan sel imun yang bertanggung jawab dalam mengatur kemampuan *self-renewal* dari sel punca. Di antara berbagai sel dalam *niche* dapat terjadi pertukaran sinyal yang mencakup faktor *survival* dan sinyal perkembangan. Sel punca kanker juga tergantung pada lingkungan yang mirip dengan keadaan normalnya, yang mungkin telah mengalami perubahan tertentu (Kanojia dan Chen, 2011).

Banyak penelitian menyebutkan korelasi antara *niche* dan tumorigenesis, yaitu fungsi *niche* yang dapat mencegah resiko tumorigenesis dengan mengatur proliferasi sel punca. *Niche* menghasilkan faktor ekstrinsik yang mengontrol jumlah sel punca, proliferasi dan apoptosis. Banyak sinyal molekuler pengatur yang menunjukkan peran dalam mengatur sifat *self-renewal*, termasuk hh, Wnts, *bone morphogenetic protein* (BMP), *fibroblast growth factors*, dan *Notch*. Dereglulasi *niche* mengarah pada proliferasi sel punca yang tidak terkontrol dan berujung pada tumor (Li dan Neaves, 2006).

2.5 Apoptosis

Apoptosis adalah suatu proses fisiologis yang dikendalikan dengan kontrol genetik yang ketat, berlangsung melalui proteolisis, kondensasi, dan fragmentasi DNA disusul dengan pengerutan sel. Kematian sel yang terprogram ini mempunyai karakteristik morfologis seperti pengerutan sitoplasma, pelepuhan membran plasma dan kondensasi kromatin. Apoptosis dikoordinasi dan sering merupakan proses bergantung energi yang melibatkan aktivasi keluarga sistein-protein yang disebut caspase.

Ada tiga fase dalam apoptosis. Fase pertama adalah fase inisiasi dimana terjadi induksi heterogen yang bergantung pada stimulus faktor yang menginisiasi

Universitas Indonesia

kematian dan adanya kenaikan rangsangan reseptor kematian tersebut. Fase kedua adalah fase efektor yang merangkum segala mekanisme reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur. Fase yang terakhir adalah fase eksekusi yang ditandai dengan peningkatan enzim katabolik dan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang secara bersamaan akan menurunkan permeabilitas mitokondria. Akibatnya adalah perubahan morfologi dan biokimia sel dimana DNA dipecah menjadi fragmen yang berbeda-beda dan dimakan oleh sel makrofag tanpa terjadi inflamasi (Boedina, 2011).

Enzim proteolitik caspase berperan penting sebagai eksekutor dalam apoptosis yang berujung pada kematian sel. Ada dua jalur utama pengaktifan caspase dalam mekanisme apoptosis, yaitu jalur intrinsik atau mitokondrial dan jalur ekstrinsik atau *death receptor*. Kerusakan atau gangguan sinyal pada salah satu atau kedua jalur tersebut akan menyebabkan tidak terjadinya apoptosis (Fulda dan Pervaiz, 2009).

Jalur ekstrinsik dimulai pada stimulasi reseptor kematian dari superfamili *tumor necrosis factor* (TNF), seperti CD95 (Fas, Apo1), *nerve growth factor receptor* (NGFR) dan reseptor *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) dengan masing-masing ligand respektif. Stimulus ini menghasilkan agregasi atau oligomerisasi reseptor dan rekrutmen protein-protein adaptor sitoplasmik yang merupakan *death domain*. Nantinya *death domain* ini akan merekrut procaspase 8 untuk membentuk *death-inducing signaling complex* (DISC). Pembentukan DISC menyebabkan aktivasi autokatalitik procaspase 8 menjadi caspase 8 dan menstimulasi fase eksekusi. Caspase 8 aktif dapat secara langsung memotong dan mengaktifkan eksekutor lain seperti caspase 3. Inhibitor rute ini adalah FLIP (FLICE-inhibitory protein), homolog procaspase 8 yang dapat menghambat secara katalitik setelah pembentukan DISC untuk mencegah apoptosis (Kruyt dan Schuringa, 2010; Fulda dan Pervaiz, 2009).

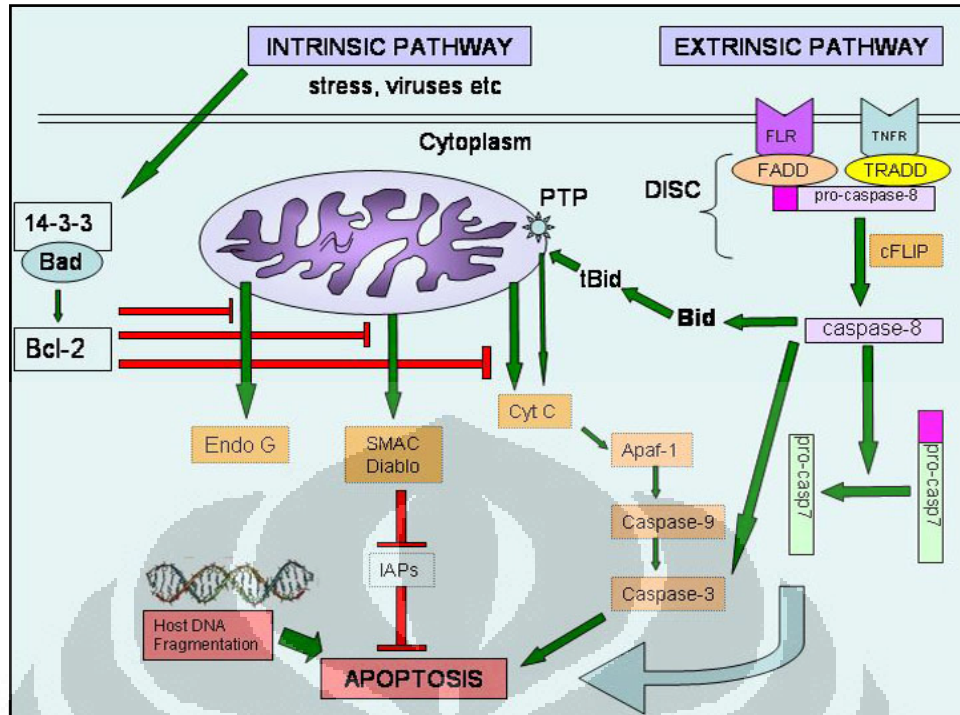
Jalur intrinsik diinisiasi oleh obat kanker, hipoksia, induksi onkogen, radiasi, atau ketidakadaan faktor pertumbuhan (Boedina, 2011). Stimulus ini menginduksi perubahan permeabilitas membran mitokondria luar dan mengaktifkan jalur mitokondria. Membran mitokondria yang permeabel

Universitas Indonesia

menyebabkan lepasnya dua kelompok protein pro-apoptik ke sitosol. Jalur mitokondria ini diatur oleh famili protein Bcl-2 (Fulda dan Pervaiz, 2009).

Kelompok pertama yang disebut *depending caspase* terdiri dari sitokrom *c* yang mengikat Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor*) dan pro-kaspase 9 membentuk kompleks apoptosom. Selain itu dilepaskan *second mitochondria-derived activator of caspase (Smac)/direct IAP binding protein with low pI* (DIABLO), dan Omi/*high temperature requirement protein A2* (HtrA2) (Riedl dan Salvesen, 2007). Smac/DIABLO mendukung aktivasi caspase dengan menetralkan protein *Inhibitor of Apoptosis* (IAP) yang menghambat caspase -3, -7, dan -9 (Verhagen et al., 2000; Hunter, LaCasse dan Korneluk, 2007).

Kelompok kedua dilepaskan ketika sel mengalami apoptosis, yaitu *Apoptosis inducing factor* (AIF) dan kompleks endonuklease G dan CAD. Overekspresi dari AIF menginduksi kondensasi kromatin, menurunkan potensial membran mitokondria, pengeluaran fosfatidilserine ke membran plasma dan fragmentasi DNA dengan berat molekul yang tinggi (50 kbp). *In vivo*, perpindahan fosfatidilserine berperan dalam pengenalan fagositosis ke sel apoptosis sehingga tidak terjadi respon inflamasi ketika memusnahkan sel tersebut. Endonuklease G bertanggung jawab dalam memakan DNA nuklear pada keadaan tanpa aktivitas caspase atau *caspase-activated deoxyribonuclease* CAD/DFP (Susin et al., 2000).



[Sumber: Anand, 2007]

Gambar 2.3. Jalur intrinsik dan ekstrinsik dari proses apoptosis

Keadaan apoptosis berbeda dengan nekrosis. Apoptosis merupakan kematian sel secara aktif dan terprogram serta diregulasi oleh aktivasi keluarga caspase. Sedangkan nekrosis merupakan proses kematian sel pasif dan tidak terkontrol yang diinduksi oleh kehilangan ATP atau gangguan pompa membran mitokondria dalam mengatur tekanan osmotik (Boedina, 2011). Nekrosis juga berkaitan dengan proses patologi yang terjadi ketika sel terpapar kondisi fisiologis yang ekstrim (contohnya hipotermia dan hipoksia). Nekrosis dimulai dengan ketidakmampuan sel mengatur homeostasis, kemudian berujung pada influks air dan ion ekstraselular. Organel dalam sel terutama mitokondria akan menggelembung dan lisis (Wyllie, Hill dan Manzow, 1998).

2.6 Analisis Apoptosis dengan Annexin V-FITC

2.6.1 Prinsip Analisis Annexin V-FITC

Pengamatan terhadap keberadaan fosfatidilserine pada membran sitoplasma difasilitasi dengan penemuan bahwa annexin V secara spesifik dapat

Universitas Indonesia

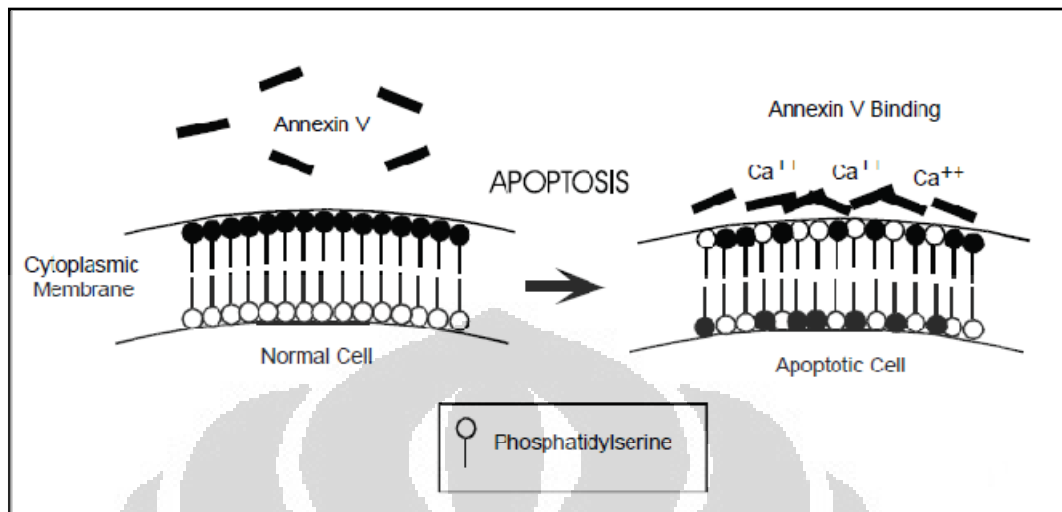
berikatan terhadap fosfatidilserine dengan adanya kalsium (Andree et al., 1990; Susin et al., 1996). Fosfatidilserine adalah aminofosfolipid yang akan keluar ke permukaan membran plasma pada saat apoptosis, di mana keberadaannya dibutuhkan untuk pengenalan dan pemusnahan sel mati. Fosfatidilserine dapat digunakan sebagai *early marker* apoptosis sel (Krysko, Berghe, D' Herde dan Vandernabeele, 2008).

Annexin V pertama kali dilaporkan oleh Bohn et al., yang mengisolasi protein dari plasenta manusia dan menyebutnya dengan istilah *placental protein 4* (PP4), dan oleh Reutelingsperger yang mengisolasinya dari tali pusar. Setelah kloning dan sekuensing dari cDNA annexin V manusia, protein tersebut disebut annexin V karena kemiripannya dengan famili protein annexin (Iwasaki et al., 1987).

Setelah melalui penelitian, diketahui bahwa annexin V mempunyai karakteristik biokimia dan fisikokimia, antara lain *in vitro* anti-fosfolipase, anti-koagulan, anti-kinase, dan aktivitas pengikatan fosfolipid. Kemampuan pelabelan biotin- atau FITC- pada annexin V dapat digunakan untuk mempelajari pelepasan fosfatidilserine pada membran luar sel dan menyediakan tidak hanya alat yang berguna untuk mengukur keberadaan fosfatidilserine di platelet dan erosit, namun juga pada apoptosis yang sedang berlangsung (Koopman et al., 1994).

Berdasarkan fenomena bahwa fosfatidilserine dikeluarkan selama apoptosis dan kemampuan annexin V untuk berikatan dengan fosfatidilserine dengan afinitas yang tinggi, Koopman et al. pertama kali mendeskripsikan metode untuk menggunakan annexin V yang dilabel secara ekstrinsik dengan hapten (contohnya FITC atau biotin) untuk mendeteksi apoptosis. Annexin V yang telah dilabel dengan hapten dan dengan kondisi keberadaan milimolar Ca^{2+} akan berikatan dengan residu fosfatidilserine yang ada di luar membran plasma sel yang mengalami apoptosis. Annexin V tidak dapat berikatan dengan sel normal karena molekul tersebut tidak dapat berpenetrasi ke dalam lapisan fosfolipid bilayer. Pada sel mati, lapisan dalam membran dapat terikat secara ekstrinsik dengan annexin V karena integritas membran plasma yang sudah hilang. Hal ini

menyebabkan annexin V juga akan berikatan dengan sel nekrosis (Plasier, Lyold, Paul dan Thomas, 1999).



[Sumber : TACS Annexin V-FITC manual kit handbook]

Gambar 2.4. Skema representatif dari pengikatan Annexin-V terhadap membran sel yang mengalami apoptosis

Untuk membedakan antara sel mati dan sel apoptosis, Propidium Iodida (PI) dapat ditambahkan pada suspensi sel. Propidium Iodida merupakan penanda DNA yang bersifat membran impermeabel. Dengan cara ini, sel apoptosis dan sel mati dapat dibedakan dengan pelabelan ganda annexin V dan PI, dan selanjutnya dapat dianalisis dengan *flow cytometer* atau mikroskop fluoresensi (Plasier et al., 1999). Uji ini cukup mudah untuk dilakukan dan dapat membedakan sel normal (annexin V⁻/PI⁻), sel apoptosis awal (annexin V⁺/PI⁻), dan sel apoptosis akhir (annexin V⁺/PI⁺), dan sel mati (annexin V⁻/PI⁺) (Vermes, Haanen, Steffens-Naaken dan Reutelingsperger, 1995).

Kombinasi Annexin V-FITC dengan PI sudah umum digunakan untuk membedakan sel hidup, apoptosis, dan sel nekrosis berdasarkan perbedaan permeabilitas membran. Propidium Iodida tidak dapat menembus membran sel yang hidup. Namun ketika sel mengalami apoptosis akhir dan nekrosis, terjadi perubahan permeabilitas membran plasma dan nuklear sehingga Propidium Iodida dapat memasuki sel dan berikatan dengan DNA sehingga menyebabkan fluoresensi merah pada sel tersebut (Reiger et al., 2010).

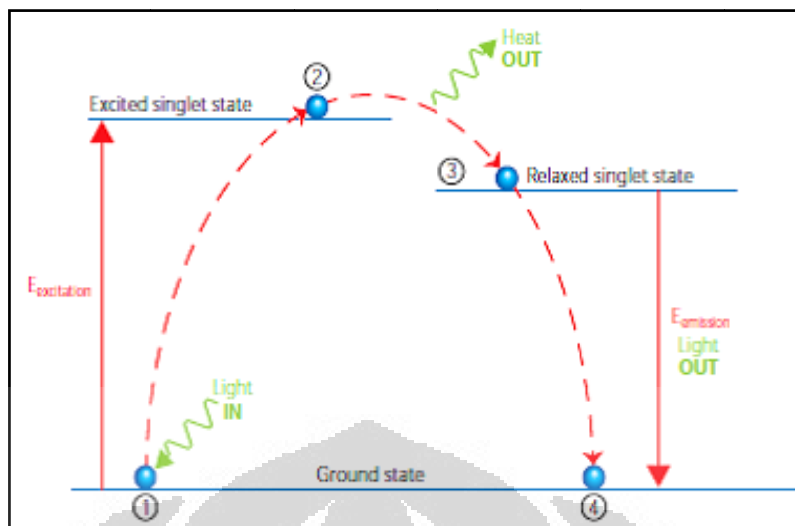
Universitas Indonesia

Menandai sel apoptosis dengan fluoresensi seperti penggunaan annexin V/PI sekarang ini dianggap metode yang tepat untuk mengevaluasi perubahan morfologi nuklear pada apoptosis (Baskic, 2006). Uji Annexin V juga mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode yang sudah ada. Pengikatan annexin V membutuhkan waktu hanya 5-10 menit, sedangkan uji berdasarkan fragmentasi DNA membutuhkan waktu 3-4 jam. Selain itu, uji annexin V mendeteksi tahap awal dari apoptosis dan dapat dijadikan uji umum untuk mengetahui onset dari kematian sel (Zhang, 1997).

2.6.2 Prinsip Fluoresensi

Fluoresensi adalah peristiwa dimana fluorofor menyerap energi cahaya (misalnya dari laser) pada panjang gelombang tertentu dan memancarkan kembali energi cahaya tersebut pada panjang gelombang yang lebih besar. Ketika cahaya diserap oleh fluorofor, elektron di dalamnya akan tereksitasi dan bergerak dari tingkat istirahat ke level energi maksimal yang disebut *excited electronic singlet state*. Jumlah energi yang dibutuhkan berbeda tiap fluorofor dan energi ini disebut dengan energi eksitasi. Proses ini berlangsung hanya dalam waktu 1-10 nanodetik karena fluorofor mengalami perubahan konformasi internal dan melepaskan sebagian energi yang diserap sebagai panas. Elektron kemudian lebih lanjut akan jatuh kepada level energi yang lebih stabil yang disebut *relaxed electronic singlet state*. Karena elektron terus menerus bergerak ke tingkat awal, dilepaskan sejumlah energi yang tersisa (disebut juga energi emisi) sebagai fluoresensi (Rahman, 2006).

Dengan prinsip ini, maka disimpulkan energi emisi jumlahnya lebih kecil dibandingkan dengan energi eksitasi, sehingga menyebabkan timbulnya warna yang berbeda dalam tahap eksitasi dan emisi. Selain itu, panjang gelombang emisi dari fluorofor akan selalu lebih panjang dari panjang gelombang emisinya. Perbedaan energi ini disebut dengan *Stokes Shift*. Umumnya akan lebih mudah untuk sebuah molekul fluorofor untuk dideteksi jika mempunyai nilai *Stokes shift* yang besar (Handoyo, 2003).



[Sumber : Rahman, 2006]

Gambar 2.5. Skema prinsip fluoresensi

Panjang gelombang eksitasi penting untuk menentukan total intensitas cahaya yang akan diserap oleh fluorofor. Misalnya, FITC akan menyerap cahaya dari 400-550 nm namun panjang gelombang 490 nm menunjukkan absorbansi paling besar. Semakin banyak absorbansi akan menimbulkan semakin intens emisi fluoresensi. Kondisi optimal ini disebut dengan panjang gelombang absorbansi maksimal dan panjang gelombang emisi maksimal. Absorbansi maksimal umumnya merujuk pada sinar spektrum laser untuk proses eksitasi. Sedangkan panjang gelombang emisi maksimal akan menentukan warna fluorofor tersebut.

Deteksi fluoresensi berguna di bidang yang sangat luas, seperti mengidentifikasi dan menghitung populasi sel, reseptor permukaan sel, mengukur aktivitas enzim, *cell sorting*, dan penelitian apoptosis. Sekarang ini terdapat banyak jenis fluorofor dengan karakteristik yang berbeda-beda. Terdapat dua jenis fluorofor, yaitu *single dyes* yang merupakan fluorofor tunggal dan *tandem dyes* yang merupakan gabungan dari dua fluorofor yang saling menukar energi dan mempunyai nilai *Stokes Shift* yang lebih besar (Rahman, 2006)

2.7 Analisis Apoptosis dengan Pengukuran Sitokrom *c*

Sitokrom *c* adalah polipeptida berukuran 15 kDa dengan 104 asam amino. Protein ini disintesis di sitoplasma dan ditransport melewati membran luar mitokondria ke dalam ruang intermitokondria via proses *receptor-independent*. Dalam ruang intermitokondria, sitokrom *c* secara aktif terlibat dalam jalur fosforilasi. Selain itu, dengan adanya sinyal apoptosis sel, sitokrom *c* akan dilepas dari mitokondria ke sitosol untuk dapat berikatan dengan Apaf-1 dan pro-caspase 9 membentuk apoptosom yang akan mengaktivasi caspase 3, 7, dan 9. Aktivasi protein caspase akan berlanjut pada apoptosis selular.

Salah satu peristiwa awal dari pengaktifan caspase adalah keluarnya sitokrom *c* dari membran luar mitokondria. Sitokrom *c* merupakan protein yang pelepasannya tidak tergantung oleh keluarga caspase (Boedina, 2011). Karena itu, lokalisasi intraselular sitokrom *c* dapat dijadikan indikator dari peristiwa apoptosis. Jones et al. (Jiang et al., 1999) menggunakan pendekatan ini untuk menunjukkan bahwa dalam cell line osteosarkoma, *immunostaining* untuk sitokrom *c* dapat menggambarkan pola pelepasan sitokrom *c* secara bertahap. Ketika apoptosis sel diinduksi, immunolabel sitokrom *c* diketahui ditemukan di bagian sitoplasma, konsisten dengan pelepasannya dari mitokondria (Taatjes, Sobel dan Budd, 2008).

Analisis *intracellular marker* seperti pelepasan sitokrom *c* dapat dilakukan untuk menentukan onset apoptosis sel karena pelepasan protein sitokrom *c* merupakan proses awal dari apoptosis (Wetzel, Green, dan Newmeyer, 1998). Analisis pelepasan sitokrom *c* juga dapat memberikan gambaran dalam menentukan peran dari jalur apoptosis mitokondria. Untuk dapat mendeteksi pelepasan sitokrom *c* dari sitosol, organel dan fraksi sitosol harus dipisahkan tanpa menyebabkan pelepasan sitokrom *c* dari mitokondria (Krysko, Berghe, D'Herde dan Vandernabeele, 2008).

Analisis protein sitokrom *c* memerlukan purifikasi protein dari sel yang sebelumnya dilisis. Tujuan pemecahan sel adalah untuk mengekstraksi produk biologis yang diinginkan namun tidak disekresi sel (Margaritis, 2007). Ada banyak metode pemecahan sel yang dapat digunakan untuk memisahkan dan

Universitas Indonesia

menganalisis protein organel sel, tergantung dari tipe sel dan lokasi dari protein yang digunakan. Metode pemecahan sel secara kimiawi dapat dilakukan dengan shok osmotik, penggunaan detergen atau pelarut organik, perlakuan dengan basa, serta digesti enzimatik. Selain itu dikenal pula metode pemecahan sel secara mekanik, meliputi *freeze-thaw*, ultrasonik, penggilingan, *French press* dan homogenizer (Negron, 2010; Margaritis, 2007).

Uji kuantitatif sitokrom *c* menerapkan teknik *sandwich enzym immunoassay* dan didesain untuk menggantikan metode *western blot*. Antibodi monoklonal spesifik untuk sitokrom *c* telah disiapkan pada mikroplat. Standar dan sampel dipipet ke dalam sumur dan adanya sitokrom *c* akan terikat pada antibodi tersebut. Setelah pencucian, setiap sumur ditambahkan *enzyme-linked monoclonal antibody specific* untuk sitokrom *c* yang akan berikatan dengan molekul antibodi-sitokrom *c*. Untuk membuang antibodi dan enzim yang tidak terikat dilakukan pencucian setiap sumur kembali. Larutan substrat nantinya ditambahkan setiap sumur dan menghasilkan warna yang menggambarkan jumlah sitokrom *c* yang terikat. Perubahan warna kemudian dihentikan dan intensitas warna yang dihasilkan diukur.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

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 Perijinan dari Komisi Etik

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

3.3 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel punca kanker payudara CS09 (IHVCB), sel fibroblas normal BHK 21 J3 (IHCVB), sel fibroblas kanker payudara CS09 (IHVCB), DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) [SAFC bioscience, USA], Fenol merah [Merck, USA], HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid) [Invitrogen, USA], FBS (*Fetal Bovine Serum*) [Invitrogen, USA], Penstrep (penisilin 10000 UI, streptomisin 10 mg dalam natrium klorida 0,9%) [Sigma, USA], Natrium bikarbonat 7,5% [Invitrogen, USA], PBS (*Phosphate Buffered Saline*) [Invitrogen, USA], tripsin-EDTA [Sigma, USA], *trypan blue* [Sigma, USA], Collagenase IV 10 mg/ml [Gibco, USA], kit TACS[®] Annexin V-FITC [Trevigen, USA], kit *Quantikine[®] Human Cytochrome c immunoassay* [R&D System, USA], H₂SO₄ [Merck, Jerman], KCl [Sigma, USA], MgCl₂ [Merck, Jerman], EDTA [Biobasic, Kanada], Dithiothreitol [Promega, USA], PI cocktail [Sigma, USA], *Sterile Water for Irrigation* [Widatra Bhakti, Indonesia], Tris-HCl [Biobasic, Kanada], Glycerol [Biobasic, Kanada], Sukrosa [Sigma, USA], Sodium Lauryl Sulfate [Promega,

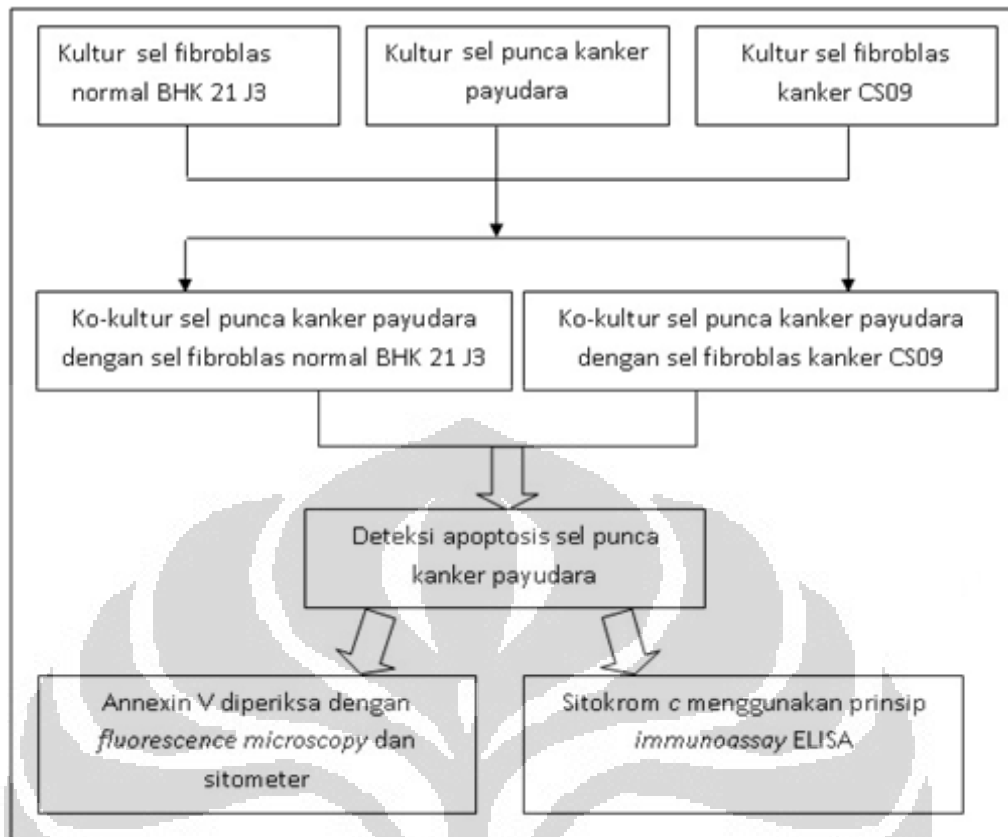
USA], *mowiol* [Sigma, USA], alkohol 96% [Pupick Med, Indonesia], dan konsumabel seperti Pipet Serologi [Costar, USA], Pipet mikro [Gilson, USA], Mikroplat 24 sumur [Falcon, USA], Pipet Tips Steril [Axygen, USA], Pipet tips filter [Axygen, USA], *Syringe Filter* [Corning, USA], Mikroplat 24 sumur *low attachment* [Corning, USA], Ependorf [Axygen, USA], Tabung konikal 50 ml; 15 ml dan 10 ml [Corning, USA], *Flask T-25* [Corning, USA], *Syringe* 1 mL dan 5 mL [Terumo, Filipina] dan slide mikroskop [Sail Brand, China].

3.4 Alat

Biosafety Cabinet (BSC) [Esco, China], Mikroskop konvokal Olympus IX-81 [Olympus, Jepang], Mikroskop *inverted* Olympus CKX41 [Olympus, Jepang], *Microplate reader* [Biorad, USA], Tali™ *Image-Based Cytometer* [Invitrogen, USA], Inkubator CO₂ IL-60160-1491 [Barnstead, USA], Mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA], *Pipette aid* [Biorad, USA], *Freezer* [Vestfrost, Denmark], *Deep freezer* -80⁰C [New Brunswick Scientific, UK], Timbangan analitik [Adventurer, USA], Lemari pendingin [Sanyo, Jepang], *Haemacytometer Chamber* [Assistent, Jerman], dan *Ultrasound disruptor* Handy Sonic UR21P [Tomy, Jepang].

3.5 Cara Kerja

Pada penelitian ini dilakukan ko-kultur sel punca kanker payudara dalam sel fibroblas normal BHK 21 J3 dan sel fibroblas kanker CS09. Awalnya sel punca kanker payudara, sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker secara terpisah dikultur pada media *DMEM high glucose*. Selanjutnya, akan dilakukan ko-kultur sel punca kanker payudara ke sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker dalam media kultur *DMEM high glucose* menggunakan plat kultur 24-sumuran. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan metode Annexin V-FITC dan dilanjutkan dengan *fluorescence microscopy* dan sitometer. Selain itu dilakukan metode pengukuran pelepasan sitokrom *c* dengan teknik *immunoassay*.



Gambar 3.1. Skema perencanaan penelitian

3.5.1 Persiapan Media Kultur Sel DMEM *High Glucose*

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sebanyak 42,25 mL ditambahkan 5 mL FBS 10%, 500 μ L *penstrep*, buffer *Sodium-Hepes* 1M 1 mL dan 1,25 mL Natrium bikarbonat lalu kocok homogen secara lembut untuk mencegah timbulnya buih dan dikerjakan pada suhu 25°C. Media kultur kemudian disterilisasi dengan teknik penyaringan menggunakan *syringe filter* 0,22 μ m dan disimpan di suhu 4°C (IHVCB, n.d. a).

3.5.2 Proses Kultur Sel

Suspensi sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker masing-masing dimasukkan ke dalam tabung konikal 15 mL, ditambahkan DMEM *high glucose* dan diresuspensi dalam 2 mL media kultur. Selanjutnya sel dipindahkan ke *flask* T-25 yang berisi 5 mL media sehingga total media mencapai 7 mL dalam setiap

flask. Inkubasi dilakukan pada inkubator dengan suhu 37°C yang dialiri 5% CO₂. Medium kultur sel diganti setiap 3-4 hari sekali atau sampai terlihat medium menguning kecoklatan. Pergantian medium dilakukan dengan membuang larutan medium yang berada dalam *flask* dengan menggunakan pipet serologi dan sebanyak 7 mL medium baru dimasukkan ke dalam *flask* tersebut.

Proses pemanenan sel fibroblas dilakukan dengan tripsin-EDTA. Sel yang sudah konfluen dan akan dipanen dicuci dengan 5 mL PBS 1X untuk kultur sel. Selanjutnya sel diinkubasi selama 8 menit dengan 1 mL tripsin-EDTA atau sampai sel terlepas dari dasar *flask*. Sel ditambahkan 2 mL medium DMEM *high glucose* dan disentrifus 300 x g selama 10 menit. Pelet diambil dan diresuspensi dalam 1 mL untuk kemudian dihitung (IHVCB, n.d. a).

Sel punca kanker payudara dikultur dalam mikroplat khusus stem cell, yaitu *low attachment 24-microplate*. Suspensi sel punca kanker payudara diresuspensi dalam 1 mL medium DMEM *high glucose* dan dimasukkan ke dalam sumuran. Perkembangan sel ditandai dengan adanya mamoser dalam kultur sel punca. Proses pemanenan dilakukan dengan meresuspensi sel dan medium berulang dalam sumuran secara hati-hati (IHVCB, n.d.a).

Setelah dipanen, sel dihitung dengan bantuan *Haemocytometer Chamber*. Sebanyak 80 µL air steril, 10 µL *trypan blue*, dan 10 µL suspensi sel yang ingin dihitung dihomogenkan perlahan. Dari campuran tersebut diambil 10 µL dan dimasukkan ke dalam kamar hitung yang telah dibersihkan. Perhitungan sel dibantu dengan mikroskop. Sel yang hidup dihitung berdasarkan jumlah sel yang tidak terwarnai oleh *trypan blue* dalam empat kamar yang berada dalam sudut *Haemocytometer Chamber*. Selanjutnya jumlah sel per mL diketahui dengan rumus dibawah ini (dimana faktor pengenceran = 10):

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

3.5.3 Kokultur Sel Punca Kanker Payudara dalam Sel Fibroblas Normal dan Kanker

Sebanyak 150.000 sel punca kanker payudara diresuspensikan ke dalam 1 mL medium kultur dan dikultur pada mikroplat dengan perlakuan berbeda tiap sumuran. Sebelum sel di ko-kultur, sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker harus disiapkan terlebih dahulu dengan mengkultur suspensi sel pada sumuran sampai 80% konfluen. Setelah dicapai pertumbuhan maksimal kemudian dilakukan pemanenan dengan mengambil keluar medium kultur dalam tiap sumuran kemudian ditambahkan *collagenase* IV 10 mg/ml sebanyak 200 μ L. Sel diinkubasi selama 5 menit dan *collagenase* IV diambil sebagai sel punca kanker. Sel fibroblas normal dan kanker akan tertinggal pada sumuran.

3.5.4 Deteksi Apoptosis dengan Annexin V-FITC

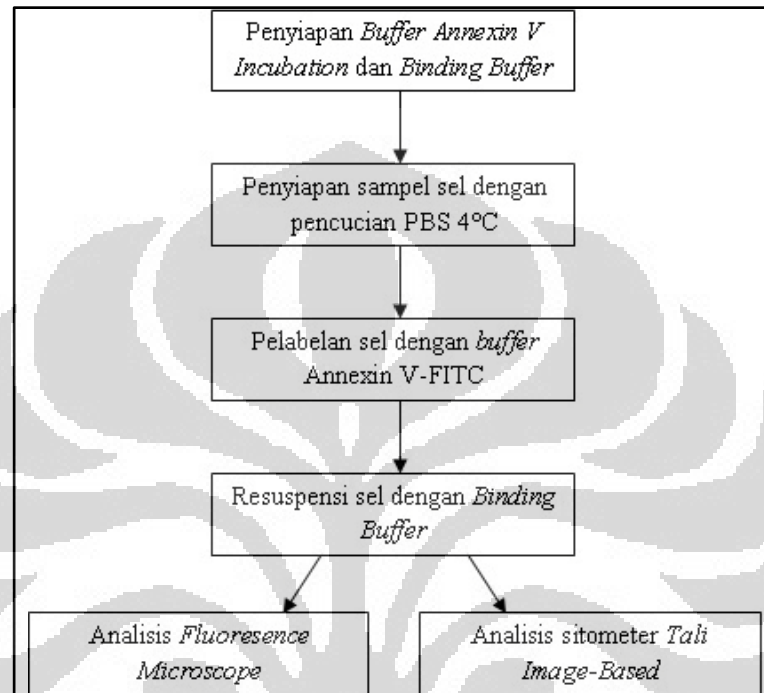
3.5.4.1 Pembuatan Reagen *Buffer Annexin V Incubation* dan *Binding Buffer*

- a. Penyiapan reagen harus dilakukan pada kondisi gelap dan di dalam es. *Buffer Annexin V Incubation* disiapkan seperlunya sesuai dengan sampel karena hanya stabil selama 2 jam. *Buffer Annexin V Incubation* 100 μ L disiapkan untuk setiap 10^5 - 10^6 sampel sel dengan mencampur 10 μ L 10X *Binding Buffer*, 5 μ L Propidium Iodida, 2.5 μ L Annexin V- FITC konsentrasi 1:200, dan 82.5 μ L air steril.
- b. Penyiapan *Binding Buffer* dilakukan di dalam es. Disiapkan 500 μ L 1X *Binding Buffer* per sampel dengan melakukan pengenceran 50 μ L 10X *Binding Buffer* dalam 450 μ L air steril.

3.5.4.2 Prosedur Pelabelan Annexin V-FITC

Sel disentrifus 300 x g selama 10 menit pada suhu ruangan. Sel kemudian dicuci dengan meresuspensikan pada 500 μ L 1X PBS dingin (4°C) kemudian disentrifus kembali sama seperti langkah sebelumnya. Secara lembut, sel diresuspensikan dalam *Buffer Annexin V Incubation* yang telah disiapkan sebelumnya. Sel diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar dan keadaan gelap. Sel disentrifus seperti tahap sebelumnya. Kemudian sel dicuci dengan meresuspensikan ke dalam 500 μ L 1X *Binding Buffer* lalu disentrifus kembali. Selanjutnya sel diresuspensikan ke 100 μ L 1X *Binding Buffer*. Sampel dianalisis

segera dengan *fluorescence microscope* dengan mengambil 25 μL suspensi sel ke *slide glass* mikroskop. Sebelum kering, sel ditambahkan 8 μL *mouviol* dan kemudian ditutup dengan *cover slip*. Sampel juga dianalisis dengan sitometer *Tali Image-Based* dengan menggunakan 25 μL suspensi sel ke slide khusus analisis sitometer.



Gambar 3.2. Langkah deteksi apoptosis dengan Annexin V-FITC

3.5.5 Pengukuran Pelepasan Sitokrom *c*

3.5.5.1 Prosedur Lisis Sel

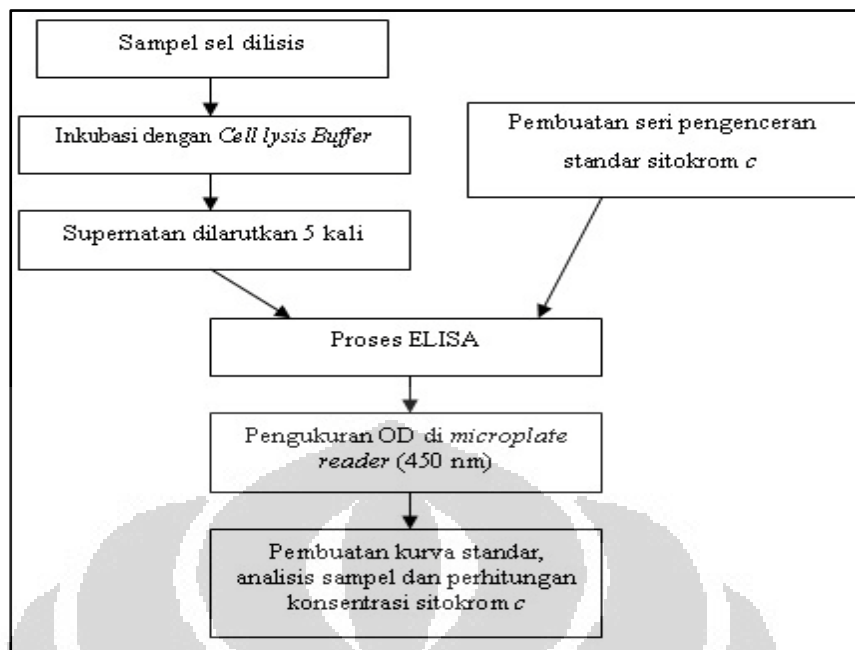
Kuantifikasi kultur sel pada pengukuran imunoasai sitokrom *c* memerlukan proses fraksinasi subsellular (Arnoult, 2007). Sel dilisis dengan 500 μL *buffer 1X Solution* (250 mM Sukrosa, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, dan 50 μL PI Cocktail). Lisat kemudian dilewatkan pada *syringe* 1 mL sebanyak 10 kali. Kemudian lisat diinkubasi dalam es 20 menit. Lisat disentrifus 720 x g selama 5 menit dan pelet dicuci lagi dengan 500 μL *buffer 1X Solution*. Lisat dihomogenkan dan dilewatkan kembali pada *syringe* 1 mL sebanyak 10 kali. Sel disentrifus 720 x g selama 10 menit. Pelet yang didapat kemudian diresuspensi dalam 500 μL *nuclear buffer* (20 mM Tris-

HCl dengan 10% gliserol dan 0.1% SDS) dan disonifikasi 3 detik 3 kali berulang. Supernatan diambil lalu disentrifus 10000 x g. Fraksi sitosolik dan membran sel didapat pada supernatan setelah sentrifus. Semua prosedur fraksinasi subselular dilakukan dalam es (4°C).

Fraksi sitosolik kemudian diresuspensi dengan 100 µL buffer *Cell Lysis 2*, diinkubasi selama 1 jam di suhu kamar dengan pengadukan yang hati-hati, lalu dihomogenkan 1000 x g selama 15 menit. Supernatan diencerkan 5 kali dengan *Calibrator Diluent RD5P 1X* dan langsung diuji atau disimpan dalam -70°C.

3.5.5.2 Prosedur Uji Sitokrom *c*

Reagen, standar dan sampel disiapkan sesuai prosedur dari produsen. Pada mikroplat, setiap sumur ditambahkan 100 µL *Calibrator Diluent RD5P (1X)* dan 100 µL standar, kontrol atau sampel. Sumur ditutup dengan strip adhesif dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. Kemudian setiap sumur dicuci empat kali dengan 360 µL *Wash Buffer*. Pada pencucian terakhir, sisa *wash buffer* diaspirasi sempurna. Konjugat sitokrom *c* ditambahkan 200 µL setiap sumur dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. Setiap sumur dicuci kembali dengan 360 µL *Wash Buffer*. *Substrate solution* ditambahkan 200 µL setiap sumur dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Setiap sumur kemudian ditambahkan 50 µL *Stop Solution* yaitu H₂SO₄ 2 M dan setelah 30 menit diukur *optical density* setiap sumur menggunakan *microplate reader* pada 450 nm.



Gambar 3.3. Langkah deteksi apoptosis dengan pengukuran pelepasan sitokrom *c*

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Persiapan Medium DMEM *High Glucose*

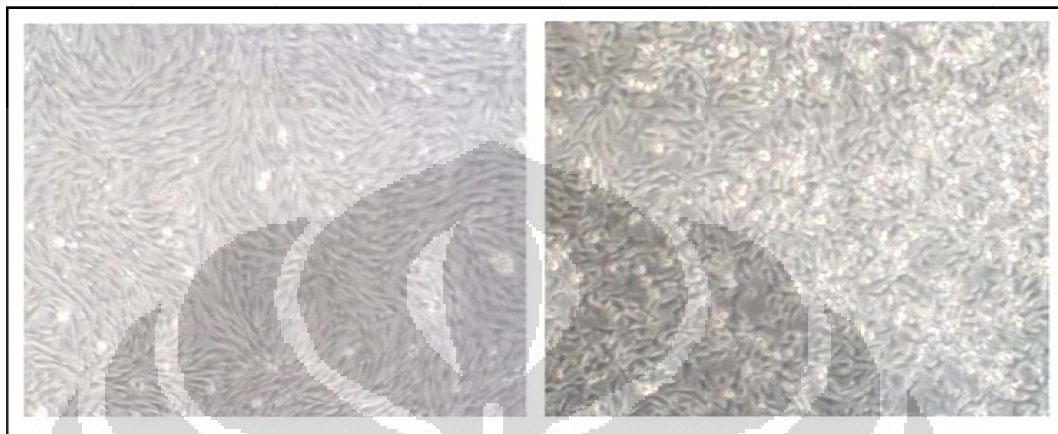
Medium komplet DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sebanyak 42,25 mL ditambahkan 5 mL FBS untuk melekatkan sel ke dasar flask, 500 μ L *penstrep* untuk mencegah kontaminasi, 1 mL *buffer* HEPES 1M dan 1,25 mL Natrium bikarbonat untuk menjaga pH. Medium dikocok homogen dengan cara membolak-balikan tabung konikal 50 mL. Setelah homogen, medium disaring dengan bantuan *syringe* 10 mL dan penyaring filter 0,22 μ m. Medium steril kemudian ditempatkan pada tabung konikal 50 mL baru yang telah dilabel dan disimpan pada suhu 4°C.

Medium komplet DMEM *high glucose* dibuat dari serbuk DMEM yang dilarutkan dalam aquades lalu disterilkan. Medium komplet DMEM *high glucose* berwarna merah karena adanya fenol merah yang ditambahkan pada pembuatan medium komplet. Fenol merah digunakan sebagai indikator pH sebagai penanda pH medium kultur tetap berkisar antara 7,4-7,6 (Freshney, 2005). Medium komplet ini mempunyai nutrisi seperti asam amino, vitamin dan garam inorganik yang penting dalam perkembangan sel. Nutrisi yang ada pada medium DMEM *high glucose* dapat dilihat pada Lampiran 1.

4.2 Proses Kultur Sel

Pada penelitian ini kami memakai *cell line* fibroblas normal koleksi IHVCB yaitu sel BHK21 dari ginjal bayi hamster karena keterbatasan sampel sel fibroblas payudara normal manusia. Untuk sel fibroblas kanker, dipakai koleksi sel IHVCB CS09 Fib p11 dari sampel sel kanker payudara manusia. Proses kultur dimulai dari pengambilan sel dari nitrogen cair. Sel yang disimpan di nitrogen cair ditambah 1 mL medium dan disentrifus untuk menghilangkan DMSO dalam *cryomedium*. Pelet diambil, kemudian dihomogenkan dengan 2 mL medium DMEM *high glucose*. Suspensi sel kemudian dimasukkan ke dalam flask T-25 yang telah diberikan 5 mL medium DMEM *high glucose* sehingga total medium DMEM *high glucose* mencapai 7 mL.

Kultur sel fibroblas normal dan kanker diamati pertumbuhannya setiap hari dan diharapkan sel fibroblas normal dan kanker dapat menempel di dasar *flask* hingga konfluen (Gambar 4.1). Apabila medium sudah berwarna kekuningan maka dilakukan proses penggantian medium yang dimaksudkan untuk menjaga keadaan sel supaya tetap hidup dan tumbuh baik.

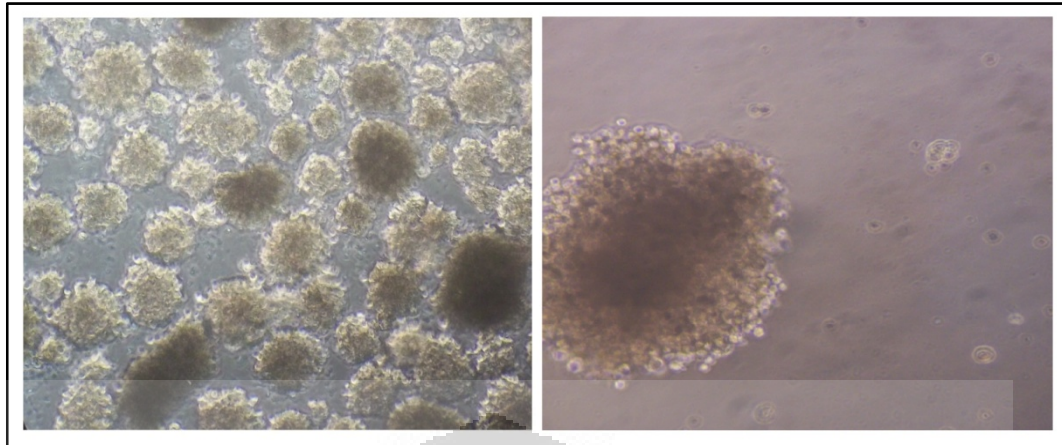


Keterangan : Perbesaran 100 kali

Gambar 4.1. Kultur sel fibroblas normal (kiri) dan kultur sel fibroblas kanker (kanan)

Dalam pengamatan kultur sel, didapati bahwa lama tumbuhnya sel fibroblas normal tidak terlalu jauh berbeda dibanding fibroblas kanker. Untuk mencapai 80% konfluen, sel fibroblas normal membutuhkan waktu sekitar 4 hari, sedangkan sel fibroblas kanker membutuhkan waktu sekitar 2-3 hari. Sel yang sudah konfluen dipanen dengan tripsin-EDTA dan disubkultur dalam *flask* baru atau disimpan dalam nitrogen cair.

Sel punca kanker payudara didapat dari sel CS09 yang ditanam di *plate* khusus, yaitu *low-attachment 24 plate* khusus untuk sel punca. *Plate* ini didesain khusus untuk mencegah diferensiasi sel punca. Sel punca kanker payudara membentuk mamosfer (Gambar 4.2) dan kaya akan ekspresi CD44⁺/CD24⁻ (Wright et al., 2008). Mamosfer adalah bentuk kultur sel punca kanker payudara yang memungkinkan propagansi sel epitel payudara dalam bentuk tidak terdiferensiasi (Dontu et al., 2003).



Keterangan : Perbesaran 100 kali (kiri) dan perbesaran 400 kali (kanan)

Gambar 4.2. Mamosfer sel punca kanker payudara

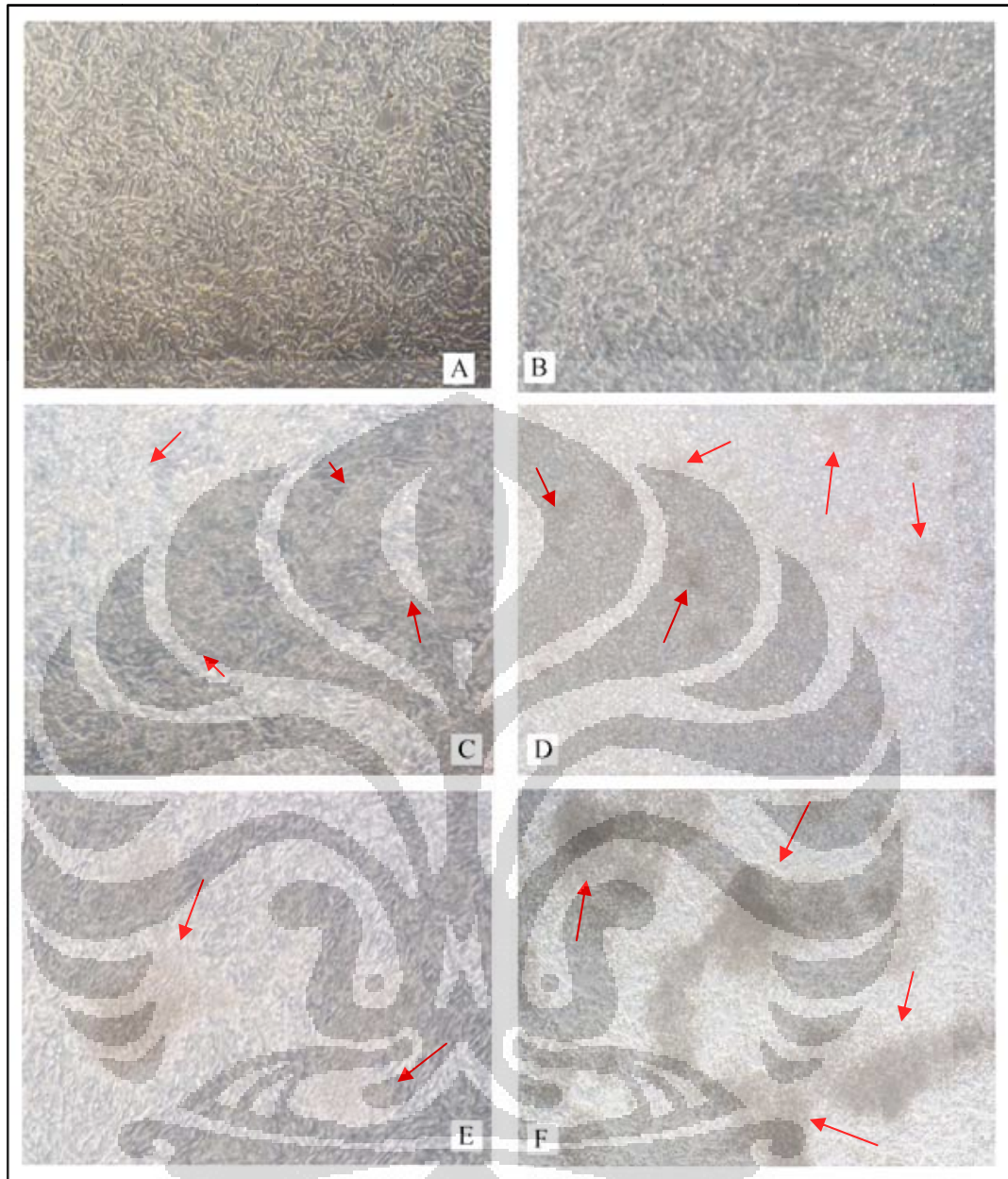
4.3 Ko-kultur Sel Punca Kanker Payudara

Setelah sel fibroblas normal, sel fibroblas kanker dan sel punca kanker payudara dikultur dengan baik, dilakukan proses ko-kultur sel punca kanker payudara dalam sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker. Awalnya sebanyak 200.000 sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker dikultur dalam tiap sumuran *plate* kultur secara terpisah. Sel fibroblas normal dan kanker membutuhkan waktu sekitar 2 hari untuk konfluen.

Proses selanjutnya adalah mengko-kultur sel punca kanker payudara. Sebanyak 150.000 sel punca kanker payudara per mL medium DMEM *high glucose* dimasukkan ke dalam tiap sumuran *feeder layer* fibroblas normal dan kanker. Jumlah sumuran disesuaikan dengan jumlah sel punca kanker payudara yang akan diuji setelah ko-kultur. Sebagai kontrol ditanam sel punca kanker payudara dengan jumlah sama ke dalam sumuran tanpa *feeder layer*.

Proses ko-kultur diamati setiap hari karena *feeder layer* fibroblas normal dan kanker memiliki pertumbuhan yang cepat. Pada hari pertama dan kedua ko-kultur, *feeder layer* fibroblas normal dan kanker tumbuh baik. Namun mulai pada hari ketiga, *feeder layer* fibroblas kanker mulai terlepas di beberapa bagian karena kondisi kultur yang mulai konfluen. Pada hari keempat, *feeder layer* fibroblas normal dan kanker mulai terlepas karena kondisi kultur yang terlalu konfluen. Hal ini juga didukung oleh medium ko-kultur yang mulai menguning pada hari ketiga.

Universitas Indonesia



Keterangan : A. Kontrol sel punca kanker payudara hari kedua; B. Kontrol sel punca kanker payudara pada hari keempat; C. Ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua; D. Ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari keempat; E. Ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua; F. Ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari keempat. Tanda panah menunjukkan sel punca kanker payudara. Perbesaran 100x

Gambar 4.3. Pengamatan ko-kultur sel punca kanker payudara pada *feeder layer* fibroblas normal dan kanker hari kedua dan hari keempat

Secara mikroskopik, terdapat perbedaan antara hasil ko-kultur sel fibroblas normal dan sel fibroblas kanker. Pada ko-kultur sel fibroblas normal, mamoser dari sel punca kanker payudara tersebar secara merata pada *feeder layer*.

Universitas Indonesia

Sedangkan pada ko-kultur fibroblas kanker, mamoser sel punca kanker payudara tampak lebih padat dan bergerombol di beberapa tempat. Kontrol sel punca kanker payudara yang ditanam di sumuran menunjukkan perkembangan yang baik dan berdiferensiasi menjadi sel fibroblas. Pada hari keempat proses ko-kultur, mamoser tampak lebih padat dan berwarna gelap. Hal ini terjadi karena *feeder layer* fibroblas normal dan fibroblas kanker mulai konfluen sehingga mudah lepas dari dasar sumuran dan bergabung dengan mamoser.

Apoptosis ko-kultur sel punca kanker payudara diuji pada hari ke dua dan hari ke empat. Hari uji ini dipilih karena pada optimasi ko-kultur didapat bahwa hari kelima *feeder layer* fibroblas kanker rusak karena terlalu konfluen. Pemanenan sel punca kanker payudara dilakukan dengan mengaspirasi medium dengan hati-hati dan menginkubasi sumuran dengan 200 μ L *collagenase IV*. Sel punca kanker payudara akan terambil dan *feeder layer* fibroblas normal dan kanker akan tertinggal di dasar sumuran. Pemanenan dilakukan dengan perlahan dan hati-hati terutama pada hari keempat mengingat kondisi *feeder layer* yang mulai rusak dan mengganggu hasil pengujian.

4.4 Deteksi Apoptosis dengan Annexin V-FITC

Untuk mendeteksi apoptosis, digunakan pewarnaan annexin V-FITC dengan konsentrasi akhir 1:200 dan pewarnaan Propidium Iodida 1:20. Annexin V telah dilabeli oleh FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*) sehingga dapat memberikan fluoresensi berwarna hijau apel pada eksitasi 490 nm dan emisi maksimal 525 nm, sedangkan PI (Propidium Iodida) memberikan fluoresensi berwarna merah pada eksitasi 536 nm dan emisi maksimal 617 nm (Rahman, 2006).

Pada pewarnaan sel dengan annexin V-FITC, suspensi sel dianalisis dengan mikroskop konvokal dan diamati apoptosis awal sel dengan ditandai dengan Annexin⁺/PI⁻ (hanya berfluoresensi hijau). Suspensi sel juga dianalisis dengan Sitometer *Tali™ Image-Based* yang dapat secara otomatis membedakan dan menghitung sel hidup, apoptosis dan nekrosis. Kuantifikasi apoptosis disebut dengan indeks apoptosis yang dihitung sebagai persentase perbandingan jumlah sel yang berfluoresensi Annexin V⁺/PI⁻ dengan total jumlah seluruh sel (Merchant, S., Gonchoroff, N., dan Hutchison, R, 2001).

Universitas Indonesia

Setelah pemanenan ko-kultur, sel punca kanker payudara disentrifus dan kemudian dilakukan prosedur pelabelan annexin V-FITC seperti prosedur. Adapun reagen yang disediakan di dalam kit uji dapat dilihat pada Lampiran 8. Sel yang telah dipanen awalnya dicuci dengan PBS 4°C yang mengandung kalsium. Keadaan dingin perlu untuk menghentikan proses biokimiawi sel. Sel kemudian diresuspensi dalam *buffer Annexin V incubation* dan diinkubasi selama 15 menit dalam keadaan gelap karena annexin V-FITC dan propidium iodida adalah senyawa yang sensitif terhadap cahaya.

Pada penelitian ini kami melakukan analisis annexin V-FITC dua kali. Hal ini disebabkan pada percobaan pertama sel yang telah dilabel annexin V-FITC tidak tampak pada mikroskop konvokal sehingga kami harus mengulang proses ko-kultur untuk mendapatkan data analisis annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal.

4.4.1 Eksperimen Pertama Analisis Annexin V-FITC

4.4.1.1 Analisis Annexin V dengan *Tali™ Image-Based Cytometer*

Sel yang telah dilabel dengan annexin V-FITC kemudian langsung diuji dengan alat Sitometer *Tali™ Image-Based Cytometer*. Alat ini berkerja dengan prinsip analisis optikal gambar dengan 3 *channel*, yaitu *bright field*, *red fluorescence*, dan *green fluorescence* sehingga dapat dipakai untuk membedakan dan menghitung sel yang tidak berfluoresensi, berfluoresensi hijau, dan berfluoresensi merah. Terdapat 4 fitur yang disediakan dalam instrumen ini, yaitu *Quick Count*, *Viability*, *Apoptosis*, dan *GFP/RFP*.

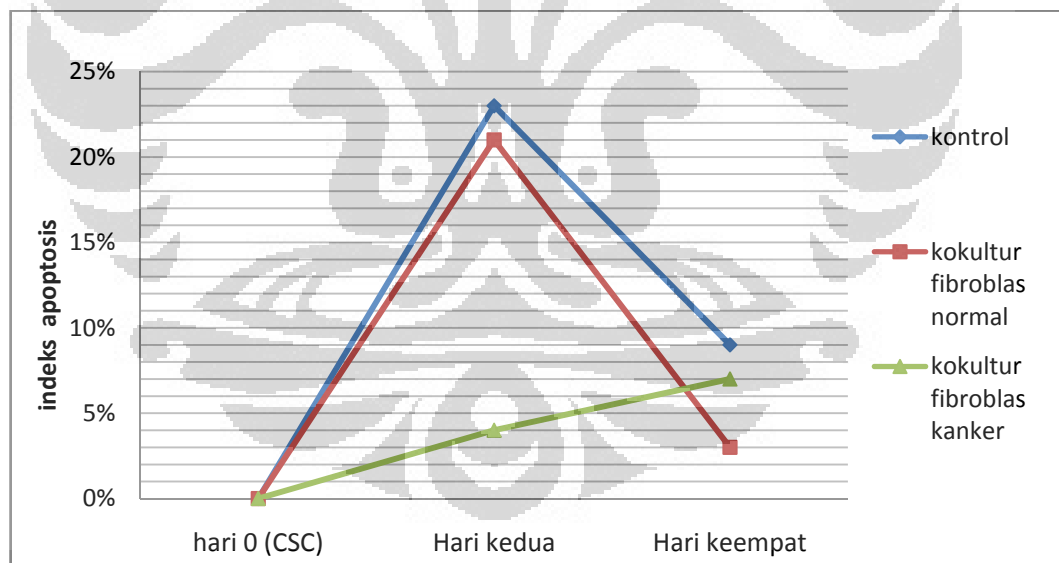
Sebanyak 25 µL sampel suspensi sel dimasukkan ke dalam *slide* khusus sitometer dan diuji dengan fitur program “Apoptosis”. Awalnya dimasukkan sampel sel yang tidak dilabeli dengan annexin V-FITC sebagai kontrol *cutoff*. Selanjutnya sebanyak 25 µL suspensi sampel mamosfer sel punca kanker payudara, suspensi sampel kontrol sel punca kanker payudara, suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker diuji dengan fitur program “Apoptosis”

Universitas Indonesia

Tabel 4.1. Hasil pengukuran eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "Apoptosis"

Sampel	<i>Live</i>		<i>Apoptotic</i>		<i>Dead</i>	
CSC	582	82%	0	0%	128	18%
Kontrol hari kedua	31	61%	14	23%	10	16%
Ko-kultur fibroblas normal hari kedua	20	48%	9	21%	13	31%
Ko-kultur fibroblas kanker hari kedua	807	63%	49	4%	416	33%
Kontrol hari keempat	294	77%	36	9%	51	13%
Ko-kultur fibroblas normal hari keempat	74	29%	7	3%	173	68%
Ko-kultur fibroblas kanker hari keempat	74	48%	10	7%	69	45%

Keterangan : perhitungan dianalisis dengan satuan jumlah sel (kolom kiri) dan persentase sel (kolom kanan)



Gambar 4.4. Grafik analisis eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "Apoptosis"

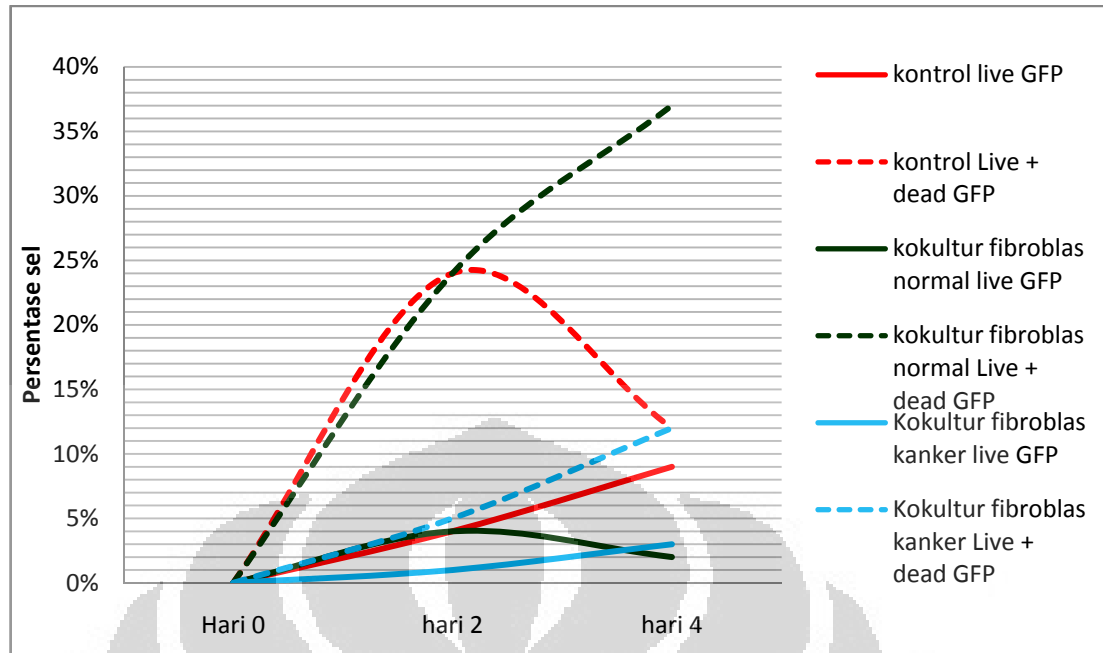
Program "Apoptosis" adalah salah satu fitur program dari *Tali™ Image-Based Cytometer* yang menampilkan informasi jumlah sel yang hidup, apoptosis, mati, rata-rata ukuran sel dan jumlah total sel yang terhitung. Setelah dioptimasi,

diketahui bahwa sel yang dianggap “*apoptotic*” pada program “Apoptosis” merupakan sel yang terwarnai dengan Annexin⁺/PI⁻, yang menghitung sel yang mengalami apoptosis awal. Untuk mengetahui sel yang mengalami apoptosis awal dan apoptosis akhir, maka kami melakukan analisis program pengukuran “GFP/RFP”. Fitur program ini dapat menghitung sel yang berfluoresensi hijau (*Live GFP*), sel yang berfluoresensi hijau dan merah (*Dead GFP*), dan sel yang tidak berfluoresensi (*Total viability*). Dengan fitur ini, maka dapat diambil kesimpulan bahwa katagori *live GFP* merupakan sel yang mengalami apoptosis awal (Annexin⁺/PI⁻) dan katagori *dead GFP* merupakan sel yang mengalami apoptosis akhir (Annexin⁺/PI⁺).

Tabel 4.2. Hasil pengukuran eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program ”GFP/RFP”

Sampel	<i>Total Viability</i>	<i>Live GFP</i>		<i>Dead GFP</i>	
CSC	74%	-	0%	-	0%
Kontrol hari kedua	72%	3	4%	17	20%
Ko-kultur fibroblas normal hari kedua	65%	2	4%	9	20%
Ko-kultur fibroblas kanker hari kedua	84%	9	1%	45	4%
Kontrol hari keempat	84%	33	9%	12	3%
Ko-kultur fibroblas normal hari keempat	31%	4	2%	87	35%
Ko-kultur fibroblas kanker hari keempat	41%	4	3%	14	9%

Keterangan : perhitungan dianalisis dengan satuan jumlah sel (kolom kiri) dan persentase sel (kolom kanan)



Gambar 4.5. Grafik analisis eksperimen pertama Annexin V-FITC dengan *TaliTM Image-Based Cytometer* fitur program "GFP/RFP"

Dari hasil analisis program Apoptosis (Gambar 4.4) dapat dilihat index apoptosis pada hari kedua ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas normal dan kontrol sel punca kanker payudara memiliki nilai yang hampir sama. Namun pada hari keempat, indeks apoptosis kontrol sel punca kanker payudara menurun. Persentase "died" dari kontrol sel punca kanker payudara juga paling kecil dibandingkan dengan sampel lain. Hal ini diduga karena sifat *self renewal* yang dimiliki oleh sel punca kanker payudara dan juga adanya mekanisme resistensi terhadap apoptosis (Fulda & Pervaiz, 2010).

Pada hari keempat, indeks apoptosis ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal juga menurun. Tetapi hal ini disebabkan semakin banyak sel yang awalnya mengalami apoptosis awal berkembang menjadi apoptosis akhir yang ditandai dengan nilai *dead GFP* yang tinggi (Tabel 4.2). Ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas normal menunjukkan peristiwa apoptosis (awal dan akhir) yang meninggi dari hari kedua ke hari keempat dibandingkan sampel lain (Gambar 4.5). Sedangkan peristiwa apoptosis (awal dan akhir) ko-kultur sel punca kanker payudara dalam fibroblas kanker menunjukkan angka yang relatif stabil (Gambar 4.4).

4.4.1.2 Analisis Annexin V-FITC dengan Mikroskop Konvokal

Mikroskop konvokal atau mikroskop fluoresensi adalah mikroskop yang dapat menciptakan gambar spesimen yang tajam dibandingkan dengan mikroskop konvensional. Umumnya dalam aplikasi biologi, mikroskop konvokal ini dipakai untuk menstimulasi fluoresensi dari spesimen yang berfluorofor. Selain itu mikroskop konvokal telah digunakan secara efektif untuk mempelajari bentuk tiga dimensi dari sel (Semwogerere dan Weeks, 2007).

Sebanyak 25 μ L suspensi sampel mamoser sel punca kanker payudara, suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker, dan suspensi sampel kontrol sel punca kanker payudara diletakkan di atas kaca mikroskop dan diberi 8 μ L *mowiol* sebagai medium perekat. Setelah preparat kering maka preparat diperiksa dengan mikroskop konvokal. Sebagai kontrol *cutoff* digunakan preparat sel yang tidak diwarnai dengan annexin V-FITC.

Pengambilan foto sel disamakan menjadi 50 sel setiap sampel dan dihitung persentase sel yang tidak terwarnai (sel hidup), sel yang terwarnai dengan annexin V-FITC (apoptosis awal), sel yang terwarnai dengan annexin V-FITC dan PI (apoptosis akhir), dan sel yang terwarnai dengan PI (nekrosis atau debris sel) (Yarandi et al, 2010). Indeks apoptosis dihitung sebagai persentase perbandingan jumlah sel yang berfluoresensi Annexin V⁺/PI⁻ dengan total jumlah seluruh sel (Merchant, Gonchoroff dan Hutchison, 2001).

Pada eksperimen pertama analisis annexin V-FITC, ditemukan adanya kesulitan dalam pengambilan fokus gambar sehingga kami tidak mendapatkan hasil analisis yang baik dari mikroskop fluoresensi. Jumlah sel yang terlalu sedikit juga menjadi faktor penyebab kami memutuskan untuk mengulang ko-kultur untuk mendapatkan uji annexin V-FITC dengan analisis mikroskop konvokal.

4.4.2 Eksperimen Kedua Analisis Annexin V-FITC

Eksperimen kedua analisis annexin V-FITC serupa dengan eksperimen pertama, namun kami menggunakan lebih banyak sumuran kultur untuk mendapatkan jumlah sel ko-kultur terpanen yang lebih banyak. Diharapkan

dengan menambah jumlah sel ko-kultur yang terpanen, analisis annexin V-FITC yang sebelumnya tidak terlihat dapat dilakukan.

Proses ko-kultur pada sumuran dilakukan sama seperti metode sebelumnya, namun didapati beberapa perbedaan yang terjadi. Medium ko-kultur pada eksperimen kedua ini sudah mulai berwarna kuning pada hari kedua ko-kultur, dimana ketika optimasi dan eksperimen pertama hal ini terjadi pada hari ketiga ko-kultur. Medium yang berwarna kuning menandakan pH medium yang turun menjadi sekitar 6,5 (Freshney, 2005). Hal ini menyebabkan kondisi ko-kultur menjadi tidak optimal. Hanya medium sel punca kanker payudara yang ditanam tanpa *feeder layer* yang masih berwarna merah pada hari kedua. Pada hari ketiga *feeder layer* fibroblas normal dan kanker mulai terlepas di beberapa bagian dan peristiwa ini semakin banyak terjadi pada hasil ko-kultur hari keempat.

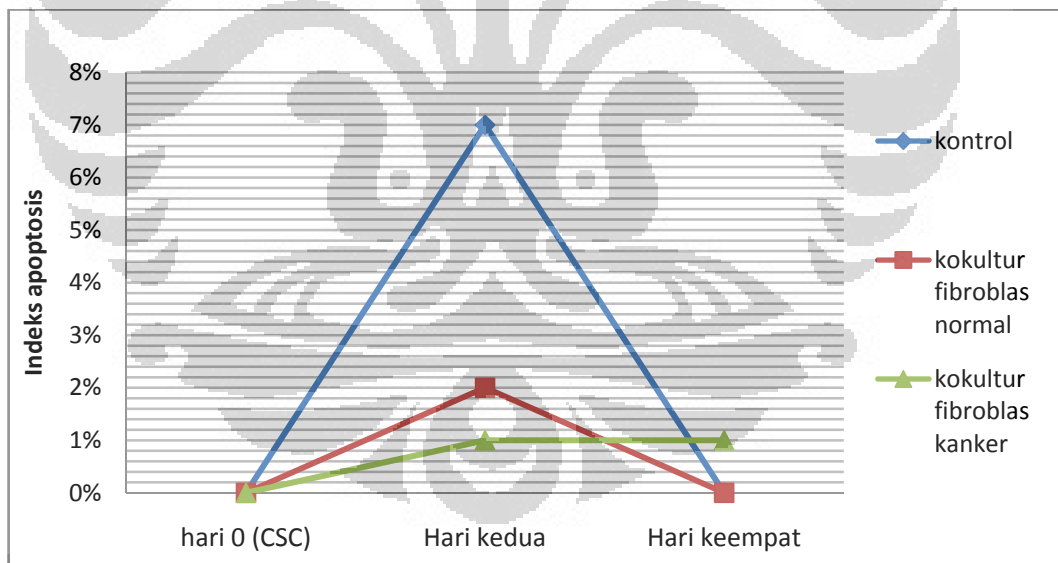
4.4.2.1 Analisis Annexin V dengan *Tali™ Image-Based Cytometer*

Setelah dipanen dan dilabel dengan Annexin V, maka sel diuji dengan *Tali™ Image-Based Cytometer*. Sebanyak 25 μ L suspensi sampel mamoser sel punca kanker payudara, suspensi sampel kontrol sel punca kanker payudara, suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan suspensi sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker diuji dengan fitur program “Apoptosis”.

Tabel 4.3. Hasil pengukuran eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "Apoptosis"

Sampel	<i>Live</i>		<i>Apoptotic</i>		<i>Dead</i>	
CSC	202	69%	2	0%	95	31%
Kontrol hari kedua	128	50%	18	7%	109	43%
Ko-kultur normal hari kedua	269	33%	18	2%	522	65%
Ko-kultur kanker hari kedua	475	27%	18	1%	1235	71%
Kontrol hari keempat	226	23%	3	0%	739	67%
Ko-kultur normal hari keempat	165	4%	0	0%	4277	96%
Ko-kultur kanker hari keempat	2508	32%	40	1%	5337	68%

Keterangan : perhitungan dianalisis dengan satuan jumlah sel (kolom kiri) dan persentase sel (kolom kanan)



Gambar 4.6. Grafik analisis eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "Apoptosis"

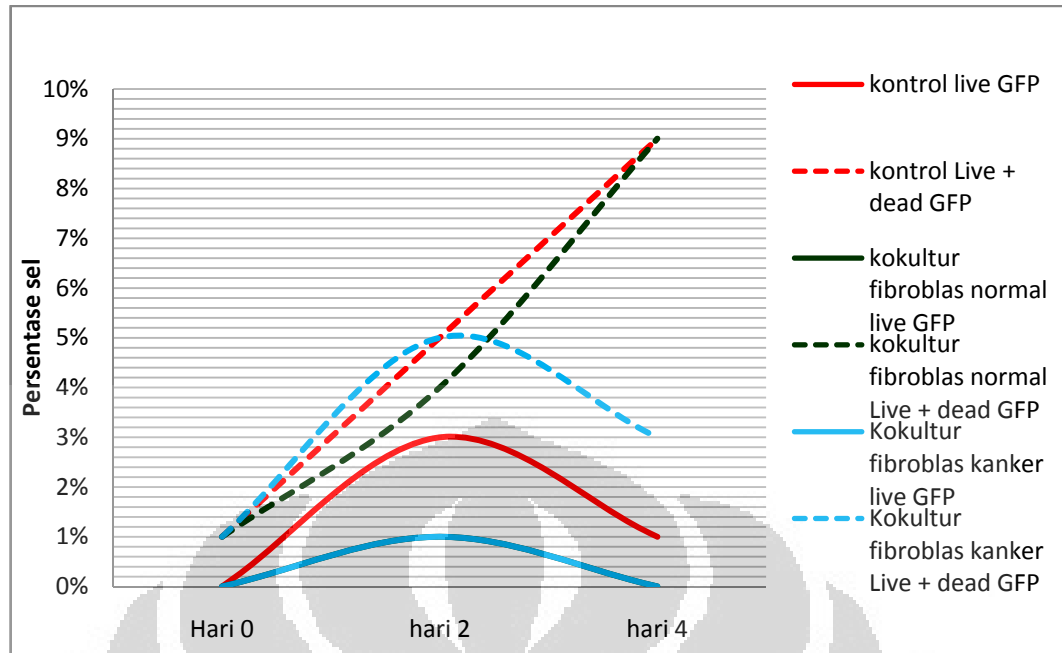
Dilakukan juga analisis sampel sel dengan fitur program "GFP/RFP" untuk menentukan jumlah sel yang berfluoresensi hijau (*Live GFP*), sel yang berfluoresensi hijau dan merah (*Dead GFP*) dan sel yang tidak berfluoresensi

(*Total viability*). Dengan fitur ini, maka dapat diambil kesimpulan bahwa katagori *live GFP* merupakan sel yang mengalami apoptosis awal ($\text{Annexin}^+/\text{PI}^-$) dan katagori *dead GFP* merupakan sel yang mengalami apoptosis akhir ($\text{Annexin}^+/\text{PI}^+$).

Tabel 4.4. Hasil pengukuran eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "GFP/RFP"

Sampel	<i>Total Viability</i>	<i>Live GFP</i>		<i>Dead GFP</i>	
CSC	77%	0	0%	17	1%
Kontrol hari kedua	71%	9	3%	17	5%
Ko-kultur normal hari kedua	41%	10	1%	28	3%
Ko-kultur kanker hari kedua	35%	20	1%	72	4%
Kontrol hari keempat	29%	6	1%	53	8%
Ko-kultur normal hari keempat	4%	0	0%	390	9%
Ko-kultur kanker hari keempat	21%	27	0%	255	3%

Keterangan : perhitungan dianalisis dengan satuan jumlah sel (kolom kiri) dan persentase sel (kolom kanan)



Gambar 4.7. Grafik analisis eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* fitur program "GFP/RFP"

Pada eksperimen kedua ini, hasil analisis Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* menunjukkan hasil yang kurang memuaskan. Pertumbuhan sel yang sangat cepat mengakibatkan kami tidak dapat mengukur proses apoptosis yang terjadi. Pada hari kedua eksperimen kedua, indeks apoptosis dari setiap sampel rendah dan banyak sel yang telah mengalami nekrosis dan menjadi debri (Tabel 4.3).

Proses apoptosis awal pada setiap sampel menunjukkan kenaikan pada hari kedua dan penurunan pada hari keempat. Index apoptosis pada ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas normal sama seperti ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas kanker. Namun jika dilihat pada keseluruhan proses apoptosis (awal dan akhir), ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal mengalami apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan dengan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker (Gambar 4.7).

Pada kontrol sel punca kanker payudara yang ditanam tanpa *feeder layer*, indeks apoptosis lebih tinggi dibanding sampel lain (Gambar 4.6). Proses apoptosis awal dan akhir pada kontrol sel punca kanker payudara juga menyamai proses apoptosis awal dan akhir pada ko-kultur sel punca kanker payudara di

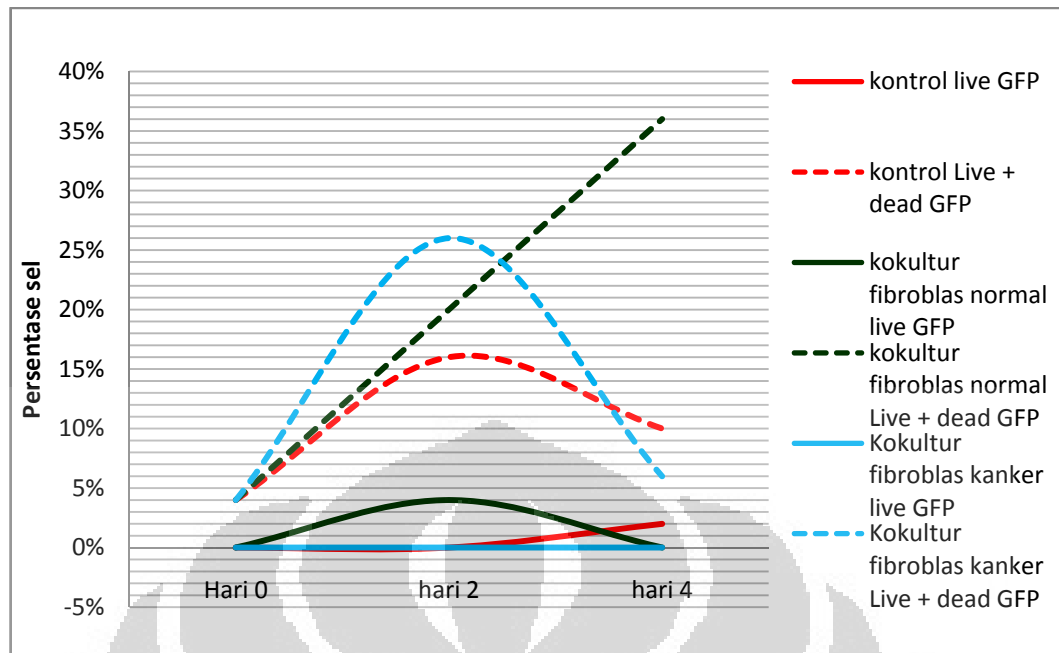
fibroblas normal (Gambar 4.7). Hal ini diduga akibat perkembangan sel punca kanker payudara yang sangat cepat dan telah berdiferensiasi menjadi sel fibroblas sehingga sifat resistensi apoptosis berkurang. Walaupun begitu, kontrol sel punca kanker payudara masih mempunyai sifat *self-renewal* yang didasari oleh persentase “*died*” yang lebih rendah dibandingkan sampel lain (Tabel 4.3).

4.4.2.2 Analisis Annexin V-FITC dengan Mikroskop Konvokal

Pada percobaan kedua analisis Annexin V-FITC, dapat dilihat fluoresensi sampel sel dengan mikroskop konvokal. Dari setiap sampel sel, gambar yang didapat kemudian disimpan dan dihitung 50 sel secara manual. Lima puluh sel tersebut nantinya dikategorikan berdasarkan fluoresensi dan dihitung persentasenya. Indeks apoptosis dihitung sebagai persentase perbandingan jumlah sel yang berfluoresensi Annexin V⁺/PI⁻ dengan total jumlah seluruh sel (Merchant, Gonchoroff dan Hutchison, 2001). Hasil perhitungan analisis Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal dapat dilihat di Tabel 4.5. dan Gambar 4.8.

Tabel 4.5. Hasil perhitungan fluoresensi sampel sel eksperimen kedua dengan mikroskop konvokal

Sampel	Hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
CSC	66%	-	4%	30%
Kontrol hari kedua	74%	-	16%	10%
Ko-kultur normal hari kedua	38%	4%	16%	42%
Ko-kultur kanker hari kedua	10%	-	26%	64%
Kontrol hari keempat	24%	2%	8%	66%
Ko-kultur normal hari keempat	0%	-	36%	64%
Ko-kultur kanker hari keempat	8%	-	6%	86%



Gambar 4.8. Grafik analisis Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal

Pada hasil analisis eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal, tidak terlihat indeks apoptosis dari setiap sampel. Namun apabila proses apoptosis akhir kita bandingkan antar sampel, ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas normal mengalami peningkatan dari 16% pada hari kedua menjadi 36% pada hari keempat. Sedangkan kontrol sel punca kanker payudara dan ko-kultur sel punca kanker payudara di fibroblas kanker menurun dari hari kedua dari 16% dan 26% menjadi 8% dan 6% (Tabel 4.5). Hal ini memperlihatkan adanya pengaruh yang diberikan fibroblas normal terhadap apoptosis sel punca kanker payudara (Gambar 4.8).

Berdasarkan hasil perhitungan fluoresensi sampel sel eksperimen kedua dengan mikroskop konvokal, dapat dilihat proses apoptosis awal yang tidak terukur. Hal ini serupa seperti analisis Annexin V-FITC dengan *Tali™ Image-Based Cytometer* eksperimen kedua yang telah dijelaskan sebelumnya. Pertumbuhan sel yang lebih cepat pada eksperimen kedua ini merupakan faktor penyebab tidak terukurnya proses apoptosis awal pada sampel. Annexin V sendiri merupakan salah satu uji apoptosis yang mendeteksi proses awal apoptosis, yaitu pengeluaran fosfatidilserine, dan untuk itu perlu onset uji yang tepat untuk dapat mengukur proses apoptosis (Van England et al., 1998). Selain itu kondisi medium

yang sudah mulai berwarna kuning di hari kedua memberikan keadaan ko-kultur yang kurang optimal sehingga persentase sel yang mengalami nekrosis tinggi.

4.5 Pengukuran Pelepasan Sitokrom *c*

Sitokrom *c* adalah protein spesifik sel yang berperan dalam fosforilasi di bagian mitokondria. Pelepasan sitokrom *c* ke luar membran mitokondria merupakan proses awal dari jalur intrinsik mitokondria yang memicu protein apoptosis sel caspase (Boedina, 2011). Pengukuran protein sitokrom *c* memerlukan proses lisis sel dan fraksinasi subselular sehingga didapat sitokrom *c* dari fraksi sitosol (Krysko, 2007). Fraksinasi subselular adalah upaya pemisahan partikel selular dari cairan biologis dan organel untuk mempelajari lebih dalam komponen subselular dan kultur sel (Pertoft, 2000). Jumlah sel yang difraksinasi antara kontrol, ko-kultur sel punca kanker payudara dalam fibroblas normal dan ko-kultur sel punca kanker payudara dalam fibroblas kanker disamakan menjadi 100.000 sel agar sitokrom *c* yang diukur berasal dari jumlah sel yang sama.

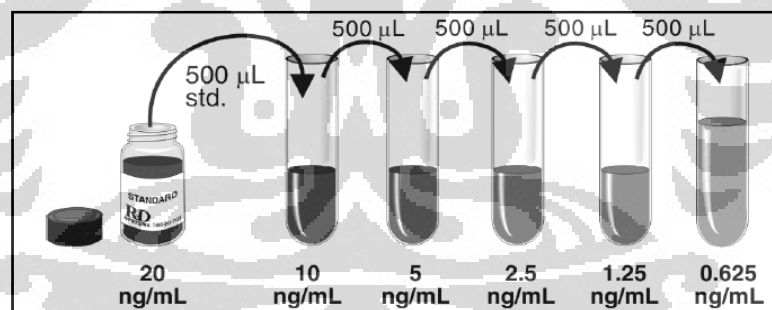
Lisis sel dilakukan dengan cara melewati sel yang telah diresuspensi dalam *buffer 1 x solution* melalui jarum *syringe* 26 G berulang kali. Metode ini dimaksudkan untuk mendisrupsi sel secara mekanik dan kimiawi. *Buffer 1 X solution* mengandung konsentrasi sukrosa yang cukup tinggi sehingga larutan dapat bersifat hipertonis. Perbedaan tekanan osmotik menyebabkan cairan dalam sel keluar, mengingat membran sel bersifat semi permeabel (Margaritis, 2007). Pemecahan sel dibantu juga dengan sonifikasi. Getaran ultrasonik umum digunakan bersamaan dengan metode disrupsi sel secara kimiawi. Sebelum disonifikasi, membran sel dilemahkan dengan ditambah *nuclear buffer* yang mengandung detergen *sodium lauryl sulfate* yang akan melarutkan fosfolipid membran sel. Protein organel akan larut dalam buffer dan disentrifus dengan kecepatan tinggi secara bertahap untuk memisahkan bagian sitosol (supernatan) dan nuklear (pelet) sel.

Setelah dilisis, maka bagian supernatan yang merupakan fraksi sitosol dilarutkan dalam *cell lysis buffer* yang dapat melarutkan protein sitokrom *c*.

Semua prosedur dan reagen serta alat yang digunakan dalam fraksinasi subsellular didinginkan terlebih dahulu agar protein yang larut tidak terdenaturasi.

Pengukuran protein sitokrom *c* dalam fraksi sitosol sampel sel dilakukan dengan teknik *sandwich* ELISA dari alat *Human Cytochrome c Immunoassay* (R&D system). Protokol perlakuan dan reagen yang digunakan pada proses imunoasai ini berasal dari kit tersebut tanpa diubah. Reagen yang disediakan dapat dilihat pada Lampiran 9. Hasil pengukuran sitokrom *c* diukur dengan *microplate reader* dan dimasukkan ke dalam kurva kalibrasi standar sitokrom *c* yang telah dibuat. Perlu diketahui bahwa sampel sel diencerkan 5 kali sehingga total konsentrasi sitokrom *c* pada sampel perlu disesuaikan.

Standar sitokrom *c* didapat dari kit dan berupa 40 ng serbuk sitokrom *c* manusia. Standar tersebut dilarutkan dalam 2 mL air steril sehingga didapat konsentrasi akhir 20 ng/mL. Untuk membuat kurva standar, standar sitokrom *c* tersebut dibuat seri pengenceran dengan *Calibrator Diluent RD5P* seperti gambar di bawah ini. Sebagai kontrol *cutoff*, digunakan larutan *Calibrator Diluent RD5P* dari kit tersebut tanpa ada sampel sel atau standar.



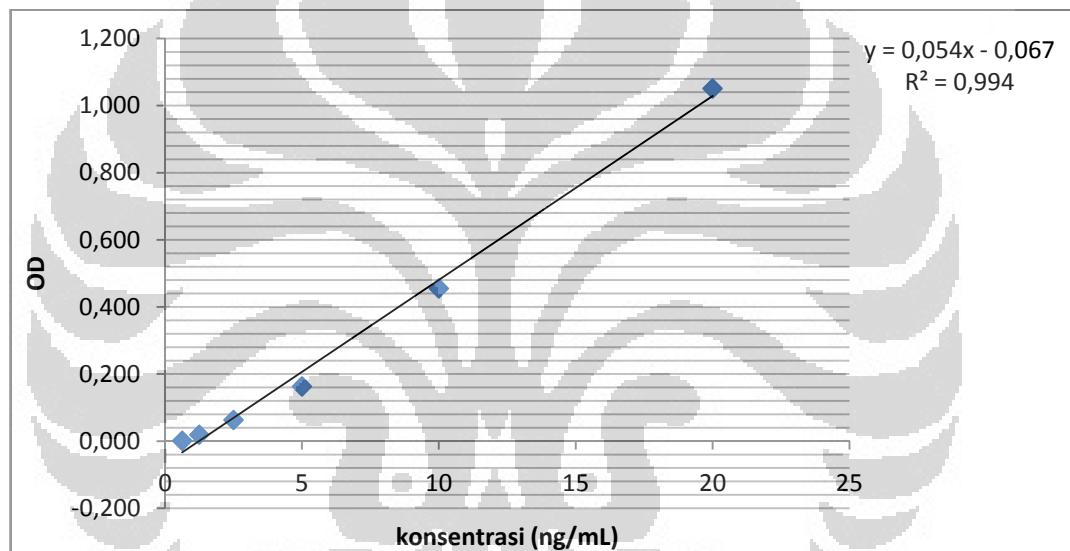
Gambar 4.9. Pengenceran standar sitokrom *c* untuk pembuatan kurva kalibrasi

Hasil pengukuran imunoasai standar sitokrom *c* kemudian diplot ke kurva kalibrasi dan didapat persamaan kurva kalibrasi yaitu $y = 0.054x - 0.071$ dengan $r = 0.9969$.

Tabel 4.6. Hasil pengukuran imunoasai standar sitokrom *c*

Konsentrasi (ng/mL)	OD	Koreksi
20	1.130	1.047
10	0.534	0.451
5	0.242	0.159
2.5	0.142	0.059
1.25	0.098	0.015
0.625	0.08	-0.003

*(kontrol *cutoff* = 0.083)



Gambar 4.10. Kurva kalibrasi standar sitokrom *c*

Sampel mamosfer sel punca kanker payudara, kontrol sel punca kanker payudara, ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal dan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker dianalisis dengan metode yang sama dan bersamaan. Setiap sampel sel dibuat duplo dan hasilnya dikoreksi dengan kontrol yang berisi *Calibrator Diluent RD5P* sesuai petunjuk kit. Hasil pengukuran pelepasan sitokrom *c* dapat dilihat pada Tabel 4.7.

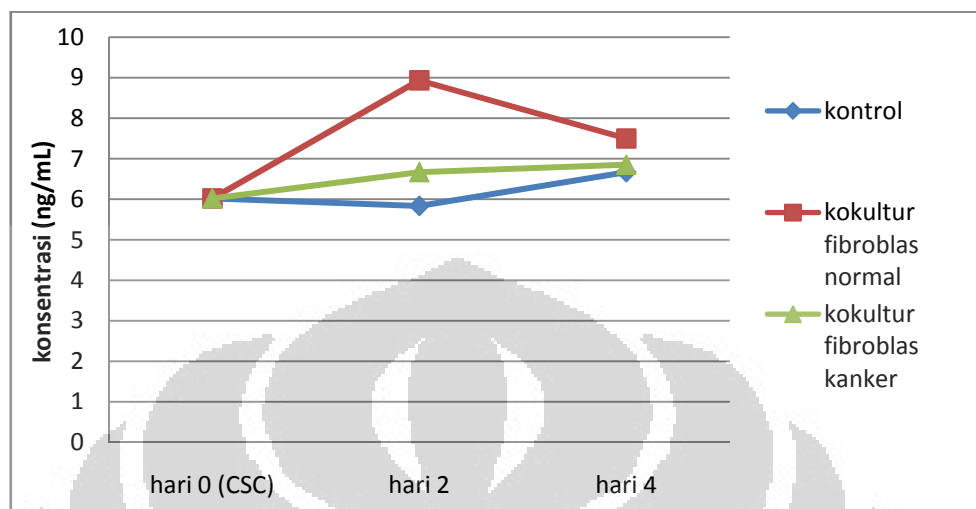
Tabel 4.7. Hasil pengukuran pelepasan sitokrom *c* pada mamoser sel punca kanker payudara, kontrol sel punca kanker payudara, ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker

Perlakuan	OD	Koreksi	Mean	Interpolasi	Konsentrasi akhir
HARI KEDUA (kontrol <i>cutoff</i> = 0.083)					
CSC	0.080 0.074	-0.003 -0.009	-0.006	1.203730	6.0185
Kontrol	0.072 0.078	-0.011 -0.005	-0.008	1.1666667	5.8333
Ko-kultur fibroblas normal	0.106 0.111	0.023 0.028	0.0255	1.787037	8.9351
Ko-kultur fibroblas kanker	0.083 0.085	0 0.002	0.001	1.3333333	6.6667
HARI KEEMPAT (kontrol <i>cutoff</i> = 0.0755)					
Kontrol	0.067 0.086	0.0165 0.0035	0.001	1.3333333	6.6667
Ko-kultur fibroblas normal	0.092 0.079	0.0025 0.0035	0.01	1.5	7.5
Ko-kultur fibroblas kanker	0.078 0.079	-0.0085 0.0105	0.003	1.3703704	6.8518

Berdasarkan hasil pengukuran pelepasan sitokrom *c*, dapat dilihat bahwa konsentrasi sitokrom *c* di ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua paling tinggi dibandingkan sampel lain (Gambar 4.11). Hal ini menunjukkan adanya pelepasan protein sitokrom *c* ke bagian sitosol untuk memulai proses inisiasi apoptosis lewat jalur mitokondria. Pada hari keempat, konsentrasi sitokrom *c* di ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal menurun, namun tetap merupakan konsentrasi paling tinggi apabila dibandingkan dengan sampel lain. Penurunan konsentrasi sitokrom *c* ini bisa menjadi penanda bahwa proses apoptosis awal tidak lagi berlangsung pada hari keempat.

Beberapa hasil koreksi pada pengolahan data sitokrom *c* menunjukkan nilai yang negatif, walaupun ketika diplot terhadap kurva kalibrasi masih memberikan hasil konsentrasi. Hal ini mungkin terjadi karena kondisi pemipetan yang kurang sempurna. Selain itu sitokrom *c* merupakan protein yang mempunyai

konsentrasi kecil sehingga memungkinkan tingginya kesalahan dalam pengukuran konsentrasi sitokrom *c*



Gambar 4.11. Grafik hasil analisis sitokrom *c* pada mamoser sel punca kanker payudara, kontrol sel punca kanker payudara, ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal, dan ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker

Sama seperti annexin-V, pengukuran pelepasan sitokrom *c* adalah penanda proses awal apoptosis sel (Li, Pinto, dan Parte, 1999; Wetzel dan Green, 1998). Jika hasil deteksi apoptosis dengan metode annexin V-FITC dan pelepasan sitokrom *c* dibandingkan, tampak adanya korelasi proses apoptosis yang dipengaruhi oleh *feeder layer* fibroblas normal. Eksperimen pertama deteksi annexin V-FITC menyimpulkan adanya proses apoptosis awal yang terjadi di hari kedua ko-kultur dan pada hari keempat ada kenaikan persentase sel yang mengalami apoptosis akhir. Hasil ini serupa dengan proses pengukuran pelepasan sitokrom *c* dari mitokondria ke sitosol. Proses apoptosis awal pada hari kedua ko-kultur ditandai dengan kenaikan konsentrasi sitokrom *c* dibandingkan dengan sampel lain. Sedangkan pada hari keempat konsentrasi sitokrom *c* menurun yang menandakan sel yang mengalami apoptosis awal menurun dan berkembang memasuki proses apoptosis akhir. Hal ini memberikan petunjuk bahwa ada pengaruh dari *feeder layer* fibroblas normal yang mengsekresikan matriks ekstraseluler tertentu sehingga menginduksi proses apoptosis sel punca kanker payudara.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

1. Berdasarkan hasil deteksi apoptosis awal dan akhir dengan Annexin V-FITC, proses apoptosis paling tinggi terjadi pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal.
2. Berdasarkan hasil pengukuran pelepasan sitokrom *c*, konsentrasi sitokrom *c* paling tinggi ditemukan pada sel punca kanker payudara yang diko-kultur dengan sel fibroblas normal.
3. Lingkungan mikro sel fibroblas normal berpengaruh terhadap apoptosis sel punca kanker payudara.

5.2 SARAN

1. Deteksi apoptosis sampel sel punca kanker payudara dengan Annexin V-FITC dan sitokrom *c* lebih baik dilakukan di tahap awal ko-kultur yaitu interval jam, mengingat kedua uji tersebut digunakan untuk mengukur proses awal apoptosis sel.
2. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan informasi mengenai mekanisme apoptosis sel punca kanker payudara yang diko-kultur sel fibroblas normal diperlukan pengujian apoptosis lainnya seperti TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) atau pengukuran protein apoptosis caspase-9.
3. Pada proses pemanenan, diperlukan modifikasi protokol kerja yang lebih selektif untuk memastikan *feeder layer* yang rusak tidak ikut terangkat sehingga dapat mengurangi kesalahan pembacaan hasil uji apoptosis.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh lingkungan mikro sel fibroblas normal dari jaringan payudara manusia terhadap apoptosis sel punca kanker payudara.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. 10 Juni 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/berita/press-release/132-enam-dan-makanan-sehat-cegah-kanker-sejak-dini.html>.
- 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.
- Anand, Sanjeev K.. (2007). Mitochondria and Viruses. <http://homepage.usask.ca/~vim458/advirol/SPCV/mitochondria/mitochondria.html>.
- Andree, H.A., Reutelingsperger, C.P., Hauptmann, R., Hemker, H.C., et al. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*. 265, 4923-4928.
- Arnoult, Damien. (2007). Apoptosis-associated mitochondrial outer membrane permeabilization assays. *Methods* 44, 229-234.
- Bapat, S.A. (2009). *Cancer Stem Cells: Identification and Target*. New York: John Wiley and sons.
- Baskic, Dejan, Popovic, Suzana, Ristic, Petar, dan Arsenijevic, Nebojs'a N. (2006). Analysis of cycloheximide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *J.Cellbi*. 30, 924-932.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., dan Moses H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 432 (7015), 332-337.
- Bisell, M.J. dan LaBarge, Mark. (2005). Context, tissue plasticity, and cancer : Are tumor stem cells regulated by the microenvironment?. *Cancer Cell*. 7, 17–23.
- Boedina, Siti. (2011). *Ilmu Dasar Onkologi*. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Bonnet D., & Dick, J.E. (1997). Human Acute Myeloid Leukimia is Organized as a Hierarchy that Originates from a Primitive Hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 3, 730-737.
- Corwin, Elisabeth. (2008). *Handbook of Patophysiology 3rd edition*. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Cummings, Brian S. dan Schnellmann, Rick G. (2002). Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 302, 1.

- Domen J., Cheshier S.H., dan Weissman L. (2000). The Role of Apoptosis in The Regulation of Hemapoetic Stem Cells: Overexpression of Bcl-2 Increases Both Their Number and Repopulation Potensial. *J. Exp. Med.* 191, 253-264.
- Dontu, G., Abdallah, W.M., Foley, J.M., Jackson, K.W., Clarke, M.F., Kawamura, M.J. & Wicha, M.S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17(10): 1253-70.
- Elaine, Marieb dan Katja, Hoehn. (2010). *Human Anatomy and Physiology*. California : Benjamin Cummings.
- Freshney, Ian. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. USA : John Wiley & Sons, Inc.
- Fulda, Simone dan Pervaiz, Shazib. (2009). Apoptosis Signaling in Cancer Stem Cells. *J. Biocel.* 42, 31-38.
- Ginestier, C. (2007). ALDH1 is a Marker of Normal and Malignant Breast Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell.* 555-567.
- Haque, M.D., Nagaoka, M., Hexig, B., dan Akaike, T. (2010). Artificial extracellular matrix for embryonic stem cell cultures: a new frontier of nanobiomaterials. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 11 014106.
- Hinz, Boris. (2007). *Extracellular matrix*. Diunduh dari ipmc.epfl.ch/.../08%20ECM%202006.pdf. tanggal 21 January 2012.
- Hunter, A.M., LaCasse, E.C., dan Korneluk, R.G. (2007). The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis.* 12, 1543-1568.
- Iliopoulos, D.; Hirsch, H. A.; Wang, G., dan Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1397-1402.
- Iwasaki, A., Suda, M., Nakao, H., Nagoya, T., et al. (1987). Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: A new lipocortin-like protein. *J Biochem Tokyo.* 102, 1261-1273.
- Kai, K., Arima, Y., Kamiya, T., dan Saya, H. (2010). Breast Cancer Stem Cells. *Breast Cancer.* 17, 80-85.
- Kass, Laura, Erler, Janine T., Micah, Demboc, dan Valerie, M. Weaver. (2007). Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *J.Biocell.* 39, 1987-1994.

- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., et al. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 84, 1415–1420.
- Kruyt, Frank A.E. dan Schuringa, Jan Jacob. (2010). Apoptosis and Cancer Stem Cells: Implications for Apoptosis Targeted Therapy. *Biochem. Pharmacol.* 80, 423-430.
- Krysko, D., Berghe, T.V., D' Herde, K., dan Vandernabeele, Peter. (2008). Apoptosis and necrosis : Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44, 205-221.
- Li, Linheng dan Naves, William. (2006). Normal Stem Cell and Cancer Stem Cell : The Matters. *Cancer Research*. 66, 4553–4557.
- Li, You-Zhi, Li, Chiang J., Pinto, Antonio dan Pardee, Arthur. (1999). Release of Mitochondrial Cytochrome C in Both Apoptosis and Necrosis Induced by β -Lapachone in Human Carcinoma Cells. *Molecular Medicine* 5, 232-239.
- Lobo, N.A., Shimono Y., Qian, D., dan Clarke M.F., (2007). *Annurev. Cellbio.* 23, 675-699.
- Lochter, Andre dan Bisell, Mina J. (1995). Involvement of Extracellular Matrix Constituents in Breast Cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 6, 3, 165-173.
- Margaritis, A., (2007). Cell Disruption Methods. *Methods* 21, 190-203.
- Merchant, S., Gonchoroff, N., dan Hutchison, R. (2001). Apoptotic Index by Annexin V Flow Cytometry: Adjunct to Morphologic and Cytogenetic Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. *Cytometry*. 46, 28-32.
- Ornella A. (2010). *Pengukuran Level RNA Gen Penanda Sel Punca Kanker Payudara dari Kultur Sel Primer Jaringan Kanker Payudara*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Pattern, Richard. (2005). Subcellular fractionation. <http://www.abcam.com/technical>.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin* 55(2), 74-108.
- Pertoft, Hakan. (2000). Fractination of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys*. 44, 1-30
- Plasier, B., Lyold, D.R., Paul, G.C., dan Thomas, C.R. (1999). Automatic Image Analysis for Quantification of Apoptosis in Animal Cell Culture by Annexin V Affinity Assay. *J.JIM* . 229, 81-95.

- Schwartz, Pamela, dan Waxman, D.J. (2001). Cyclophosphamide Induces Caspase 9-Dependent Apoptosis in 9L Tumor Cells. *Mol. Pharmacol.* 60, 1268–1279.
- Semwogerere, Dennis dan Weeks, Eric. (2007). Confocal Microscopy. *J. Of Physic Cond Matt.* 19, 102-113.
- Shekhar, M.P.V., Pauley, R., dan Heppner, Gloria. (2003). Extracellular matrix–stromal cell contribution to neoplastic phenotype of epithelial cells in the breast. *Breast Cancer Res.* 5, 130-135.
- Signore, Michele, Ricci, Lucia R., dan Maria, Rugerro. (2011). Targetting Apoptosis Pathways in Cancer Stem Cell. *Cancer Letters.* 01, 13-17.
- Sternlicht, M.D., Lochter, A, Bissell, M.J., et al. (1999). The stromal proteinase MMP3/stromelysin-1 promotes mammary carcinogenesis. *Cell.* 98, 137–146.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., et al. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *JEM.* 184, 1331-1341.
- Taatjes, D.J., Sobel, B.E., dan Budd, R.C. (2008). Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 129, 33-43.
- Takahashi, K. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 131, 5, 861-872.
- Tiara, Liza. (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.
- van Engeland M., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., dan Reutelingsperger, C.P. (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherant cells in culture. *Cytometry.* 24,131–139.
- Van Engeland, M., Nieland, L.J.W., Ramaekers, F.C.S., Schutte, B., dan Reutelingsperger, C.P.M. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 31, 1.
- Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., et al. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102, 43-53.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Naaken, H., dan Reutelingsperger, C.P. (1995). A novel assay for apoptosis-flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184:39–51.

- Visvader, J. E., dan Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Wetzel-Bossy, Ella, dan Newmeyer, Donald. (1998). Mitochondrial cytochrome *c* release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO journal* 1, 37-49.
- Wiseman, Bryony dan Werb, Zena. (2002). Stromal effects on mamary gland development and breast cancer. *Science*. 296 (5570), 1046-1049.
- Wright, M.H., Calcagno, A.M., Salcido, C. D., Carlson M.D., Ambudkar, S.V. 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.
- Wyllie, Andrew, Hill, David, dan Manzow, Simone. (1998). *Apoptosis and Cell Proliferation*, 2nd edition. Jerman : Boehringer mannheim GmbH.
- Yarandi, Nasim, Zali, Hakimeh, Shokrzgozar, M., Mansouri, V., Shahani, M., et al. (2010). Study of apoptosis inducing activity of calprotectin on fibroblast cell. *JPS vol 1*. 496, 1-7.

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. 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 : Aroem Naroeni, DEA, PhD
Principal Investigator

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

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

Jakarta, 18 JULI 2011

Ketua
Chairman

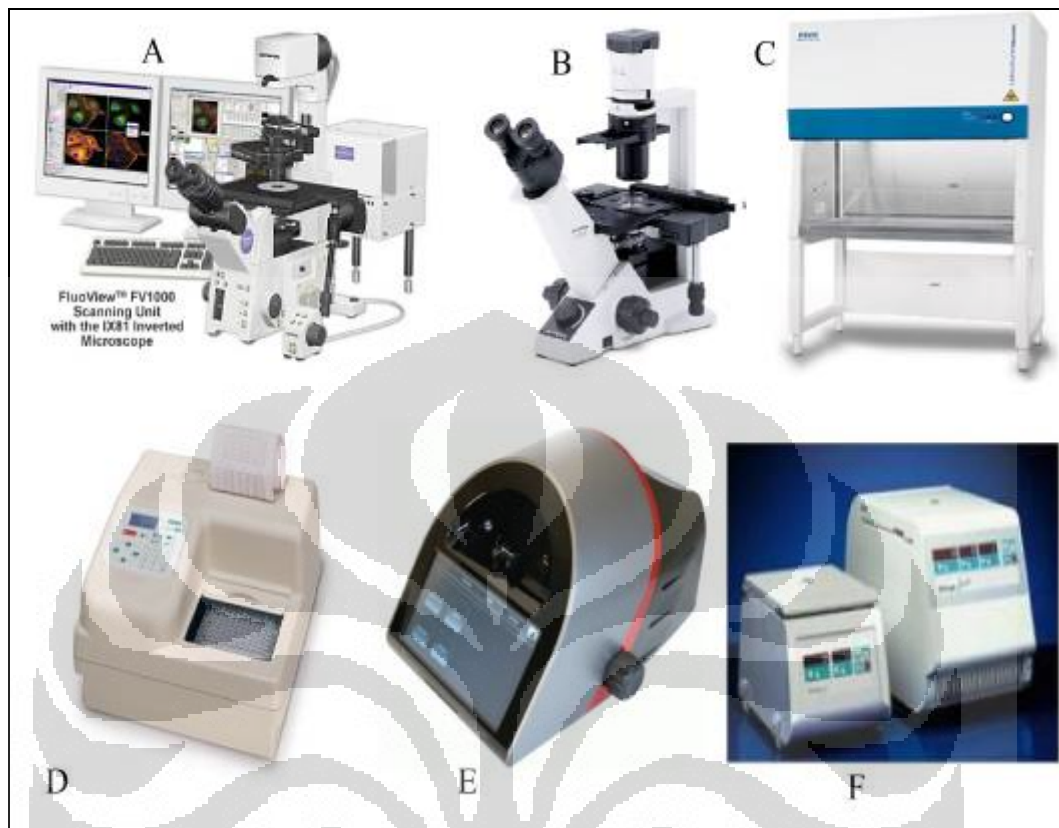

Prof. Dr. dr. Rianto Setiabudy, SpFK

*Ethical approval berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

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

Lampiran 3. Alat yang dipakai dalam penelitian



Keterangan :

- A. Mikroskop konvokal Olympus IX-81 [Olympus, Jepang],
- B. Mikroskop *inverted* Olympus CKX41 [Olympus, Jepang],
- C. *Biosafety Cabinet* (BSC) [Escó, China],
- D. *Microplate reader* [Biorad, USA],
- E. Tali™ *Image-Based Cytometer* [Invitrogen, USA],
- F. Mikrosentrifus [Sorvall-Fresco, USA].

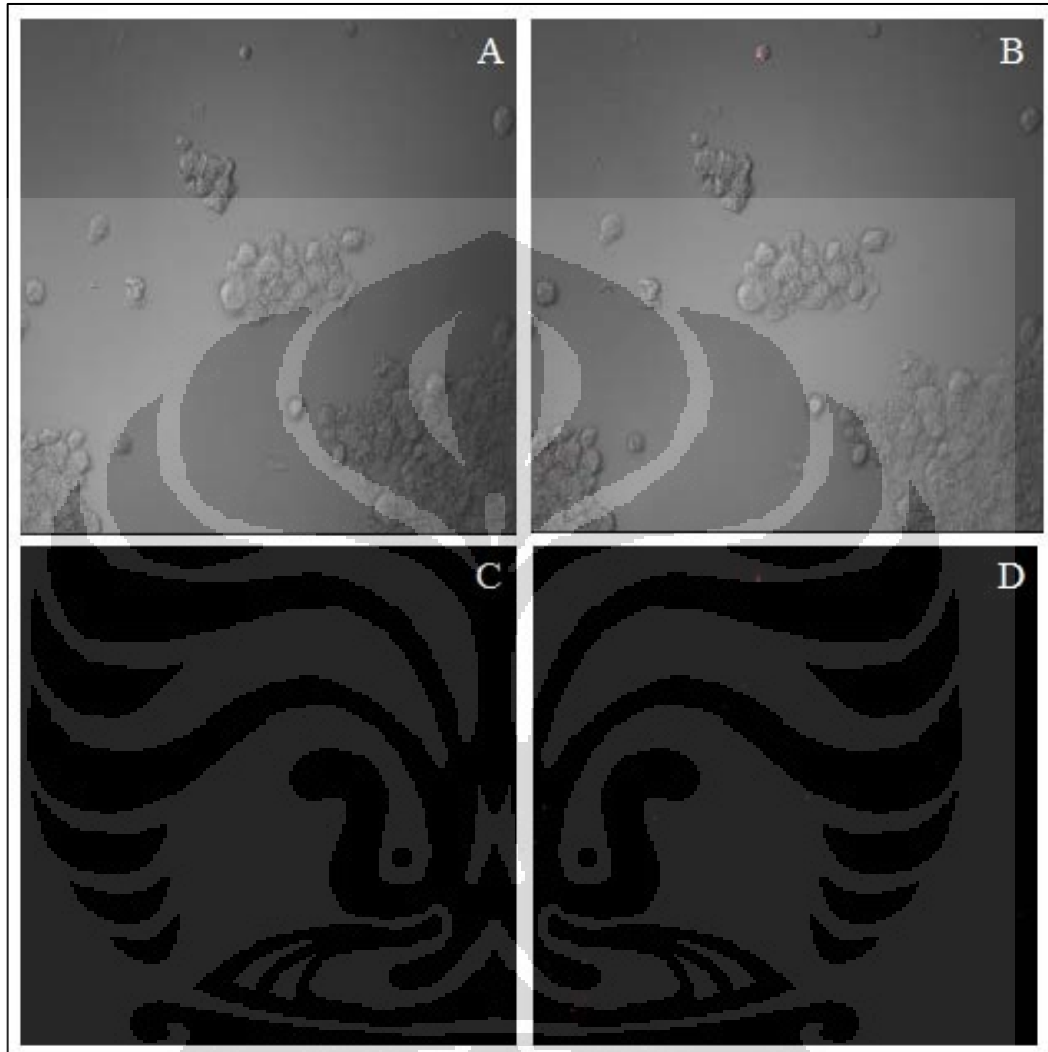
Lampiran 4. Cara pembuatan reagen dan dapar yang digunakan

No	Nama reagen	Cara pembuatan
1	Larutan stok HEPES 1 M	Sebanyak 2.383 gr HEPES dilarutkan dalam 10 ml aquades steril
2	Larutan stok MgCl ₂ 1 M	Sebanyak 2.033 gr MgCl ₂ dilarutkan dalam 10 ml aquades steril
3	Larutan stok EDTA 0.5 M	Sebanyak 1.8612 gr Na ₂ EDTA dilarutkan dalam 10 ml aquades steril
4	Dapar 1x Solution	Sebanyak 4.28 gr Sukrosa, 1 mL Larutan stok HEPES 1 M, 0.373 gr KCl, 75 µL MgCl ₂ 1 M, dan 100 µL EDTA 0.5 M ditambahkan aquades steril sampai 50 mL. Pada saat ingin digunakan, ambil 10 mL larutan tersebut dan tambahkan Larutan stok DTT 1M dan 50 µL <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> . Simpan dalam keadaan dingin
5	Larutan stok DTT (Dithiothreitol) 1 M	Sebanyak 1.5425 gr DTT dilarutkan dalam 10 mL aquades steril
6	Dapar Tris HCl 0.02 M pH 7.5	Sebanyak 0.121 gr Tris Base dilarutkan dalam 50 mL aquades steril, kemudian pH diatur dengan penambahan HCl 1 M
7	Dapar Nuklear (dapar lisis standar)	Sebanyak 10 mL dapar Tris HCl 0.02 M, 5 mL gliserol 100% dan 0.05 gr Sodium <i>Lauryl Sulfate</i> dihomogenkan dan ditambahkan dapar Tris HCl 0.02 M sampai 50 mL.

Sumber : Pattern, Richard, 2005.

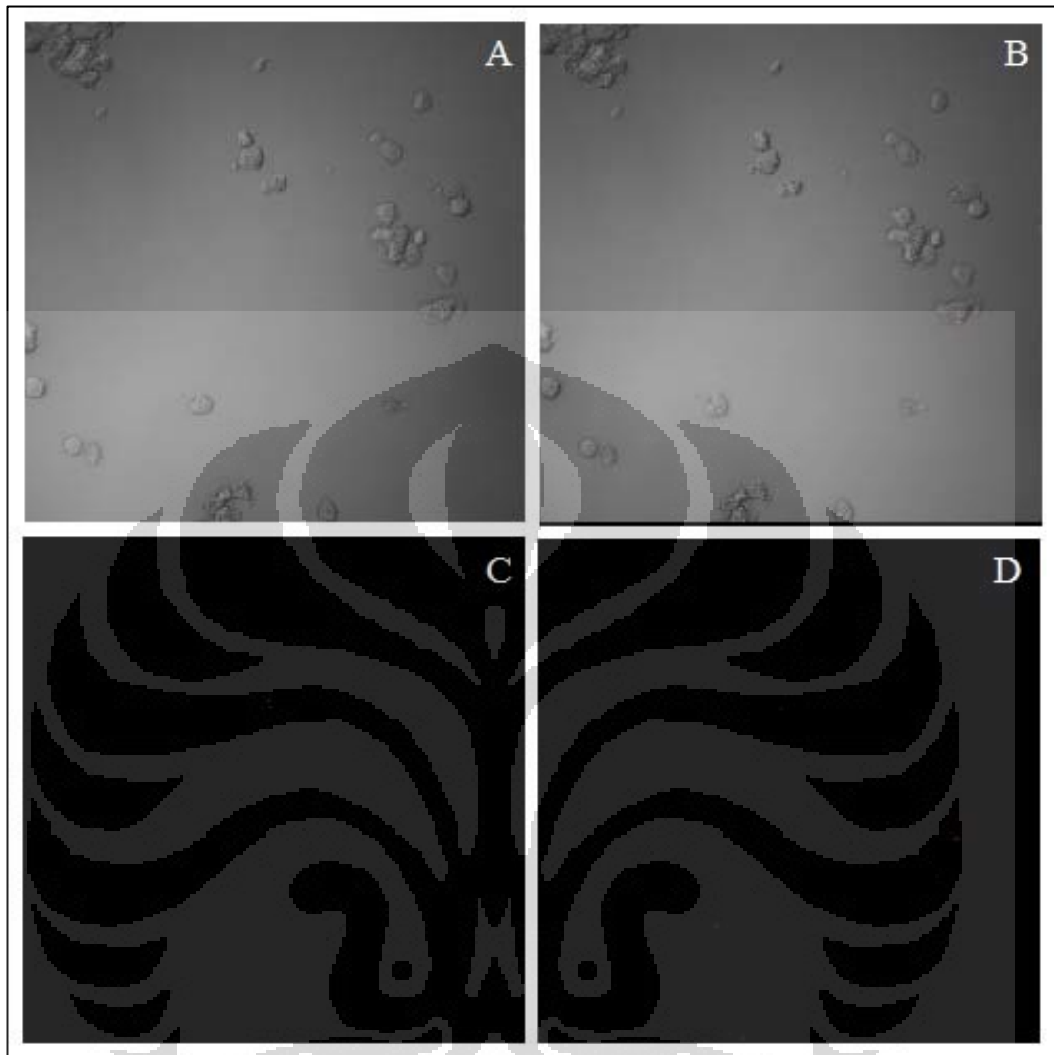
Lampiran 5. Foto sampel sel eksperimen kedua Annexin V-FITC dengan mikroskop konvokal

1) Sampel mamosfer sel punca kanker payudara – 1



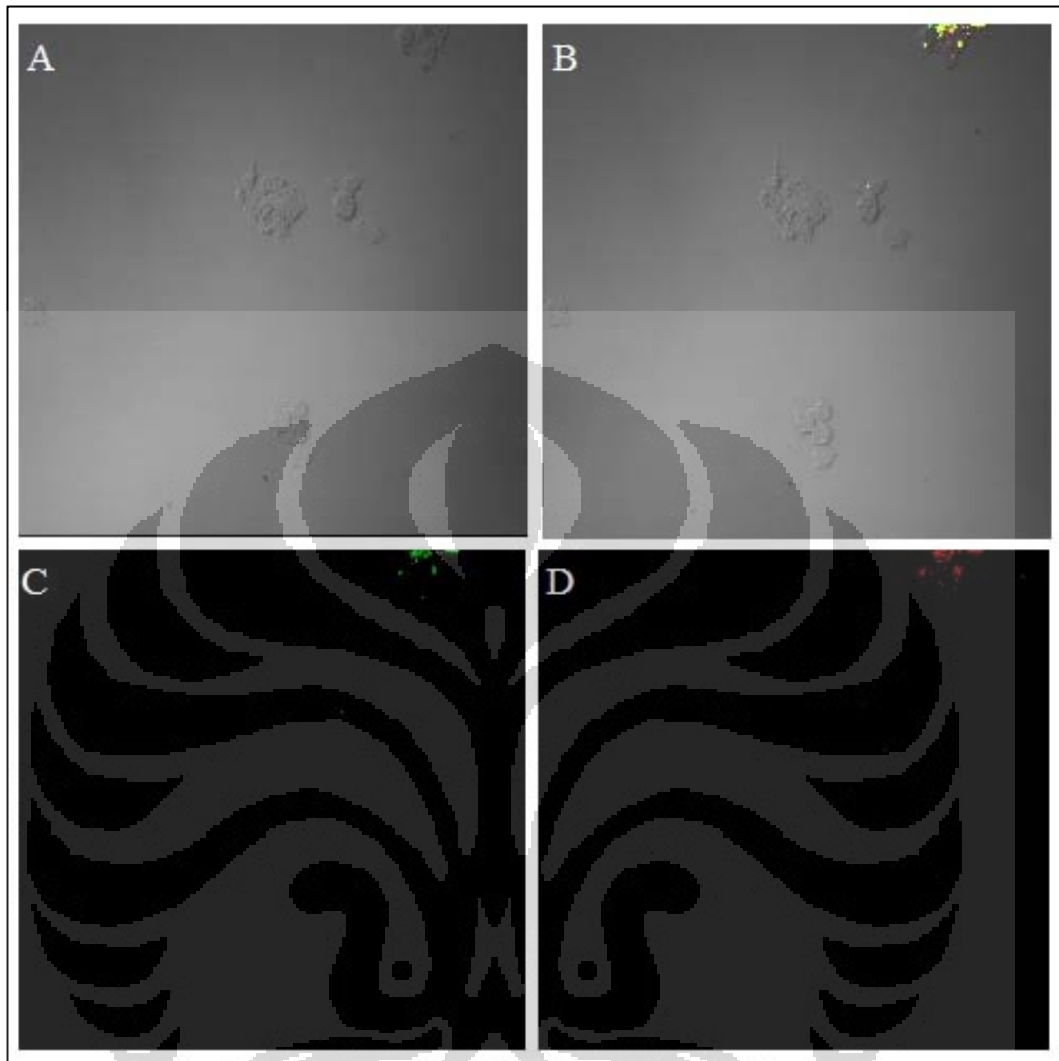
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

2) Sampel mamosfer sel punca kanker payudara – 2



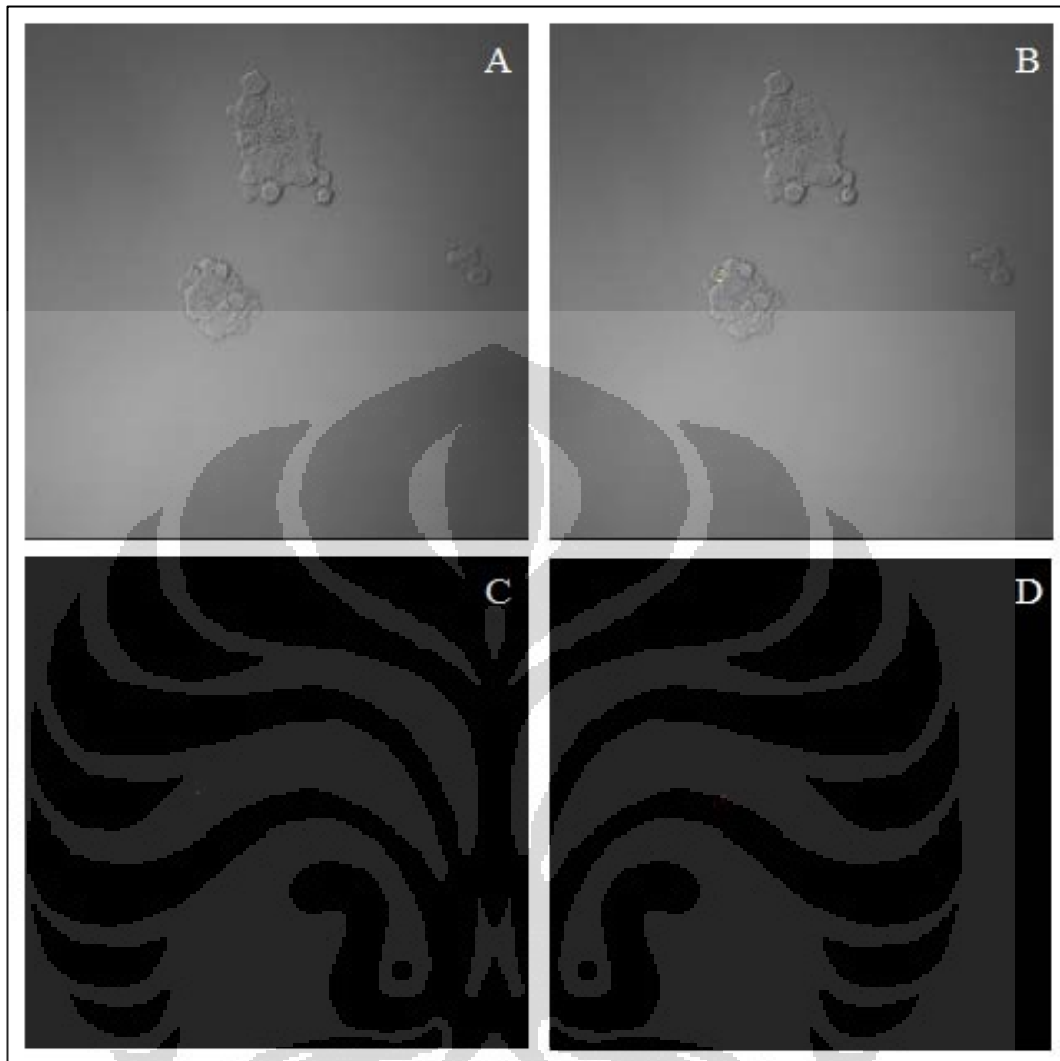
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

3) Sampel kontrol sel punca kanker payudara hari kedua – 1



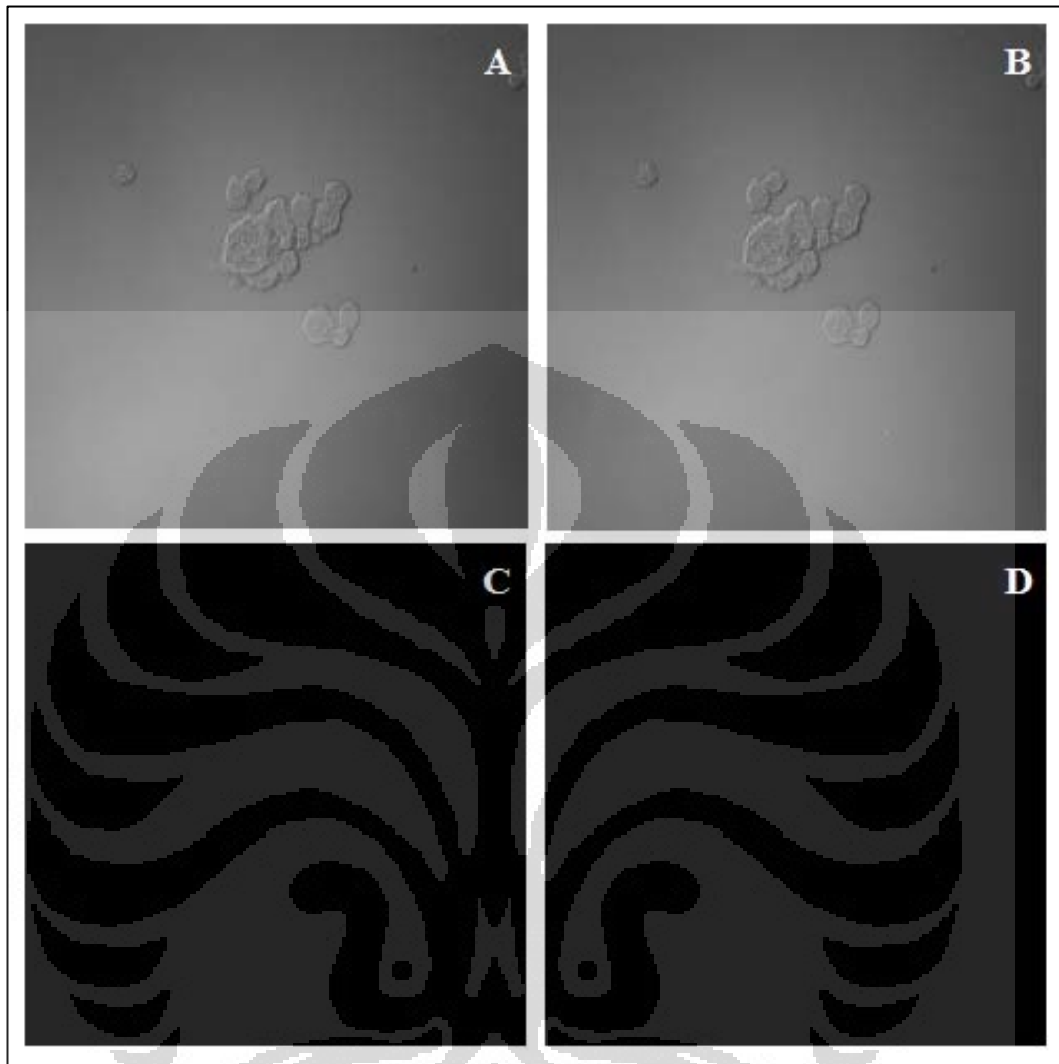
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

4) Sampel kontrol sel punca kanker payudara hari kedua – 2



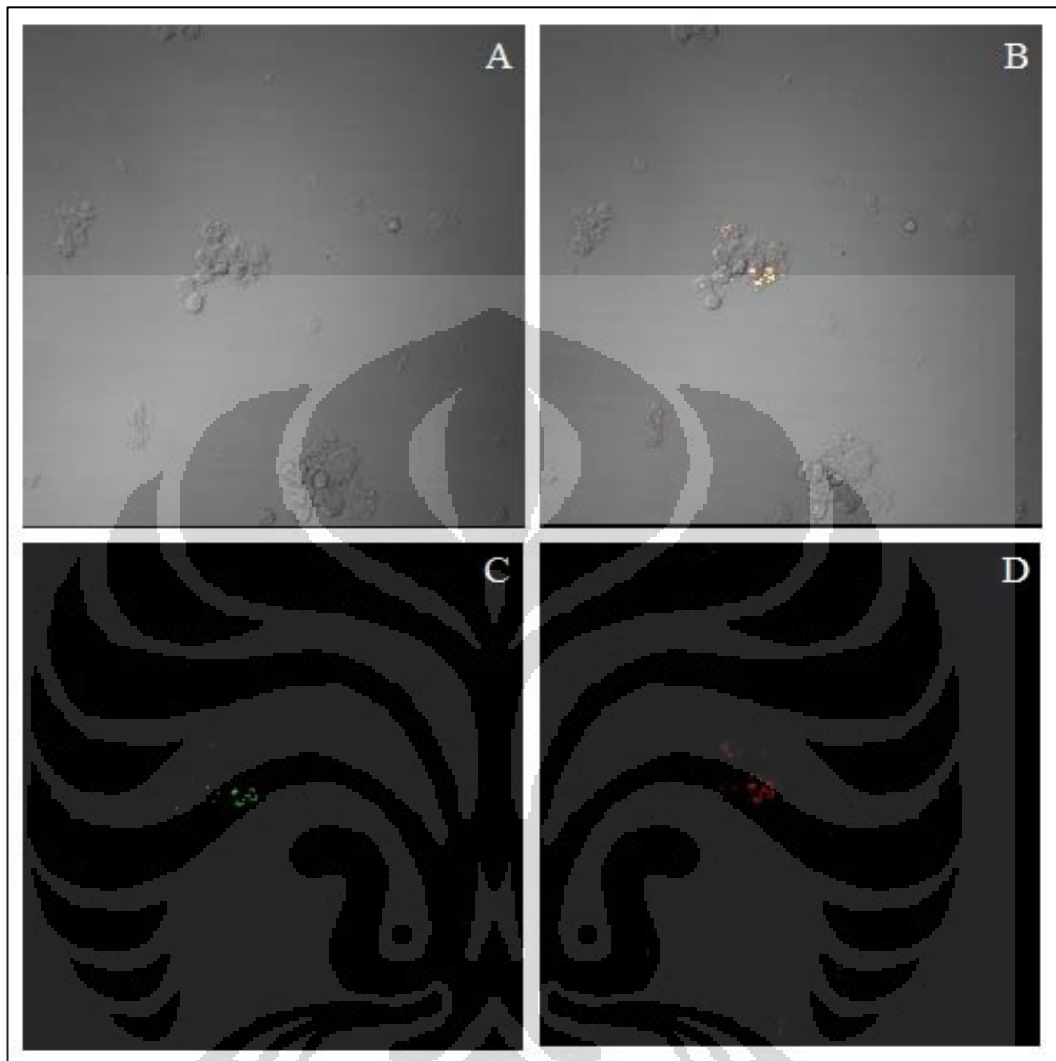
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

5) Sampel kontrol sel punca kanker payudara hari kedua – 3



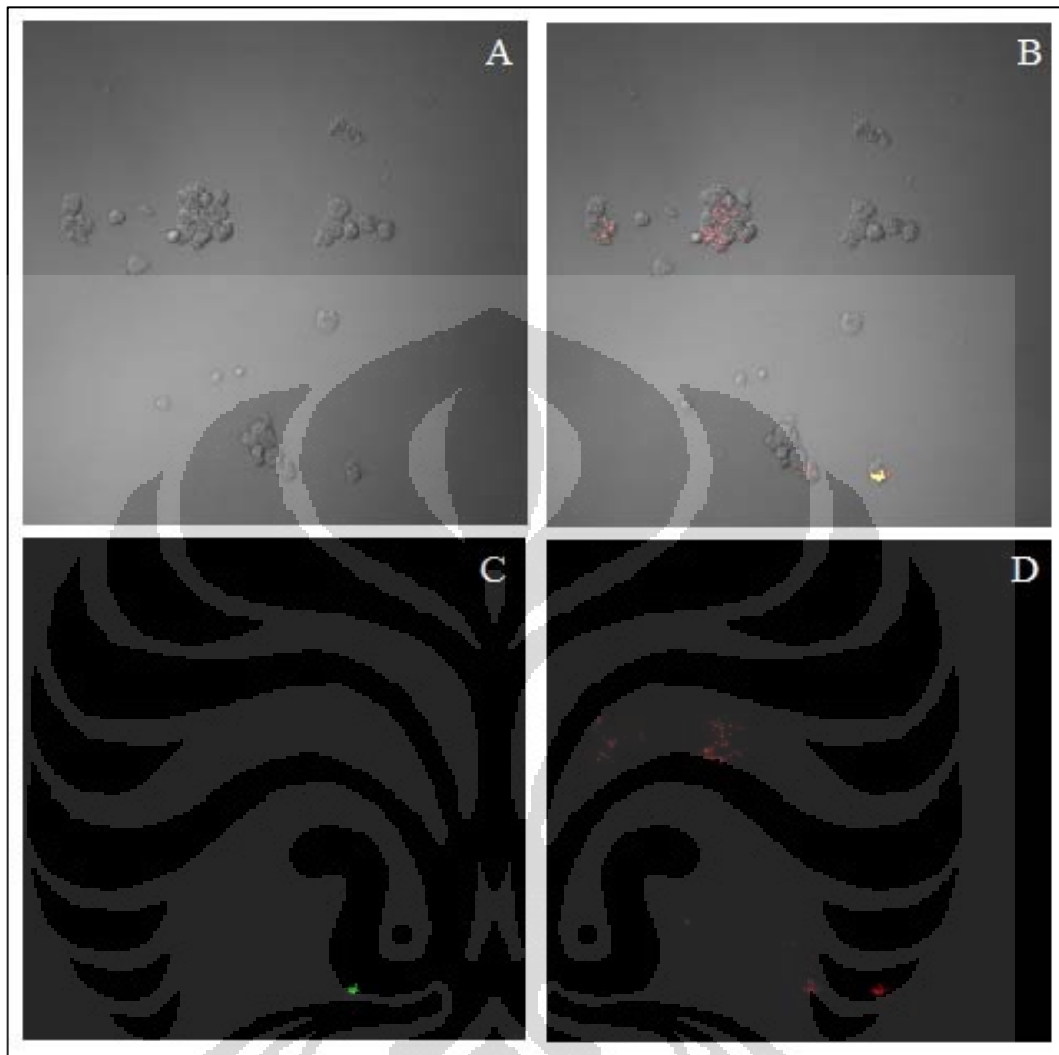
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

6) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua
- 1



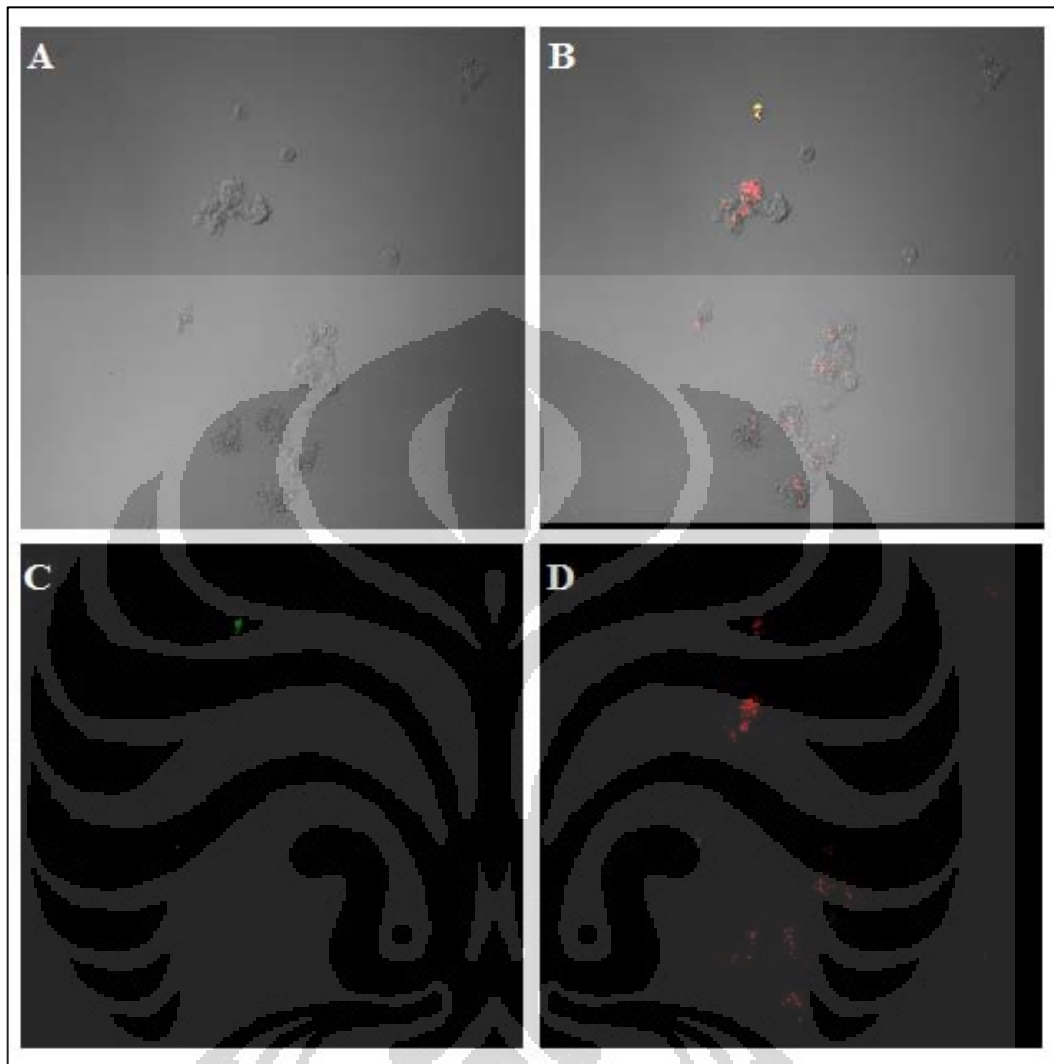
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

7) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua
- 2



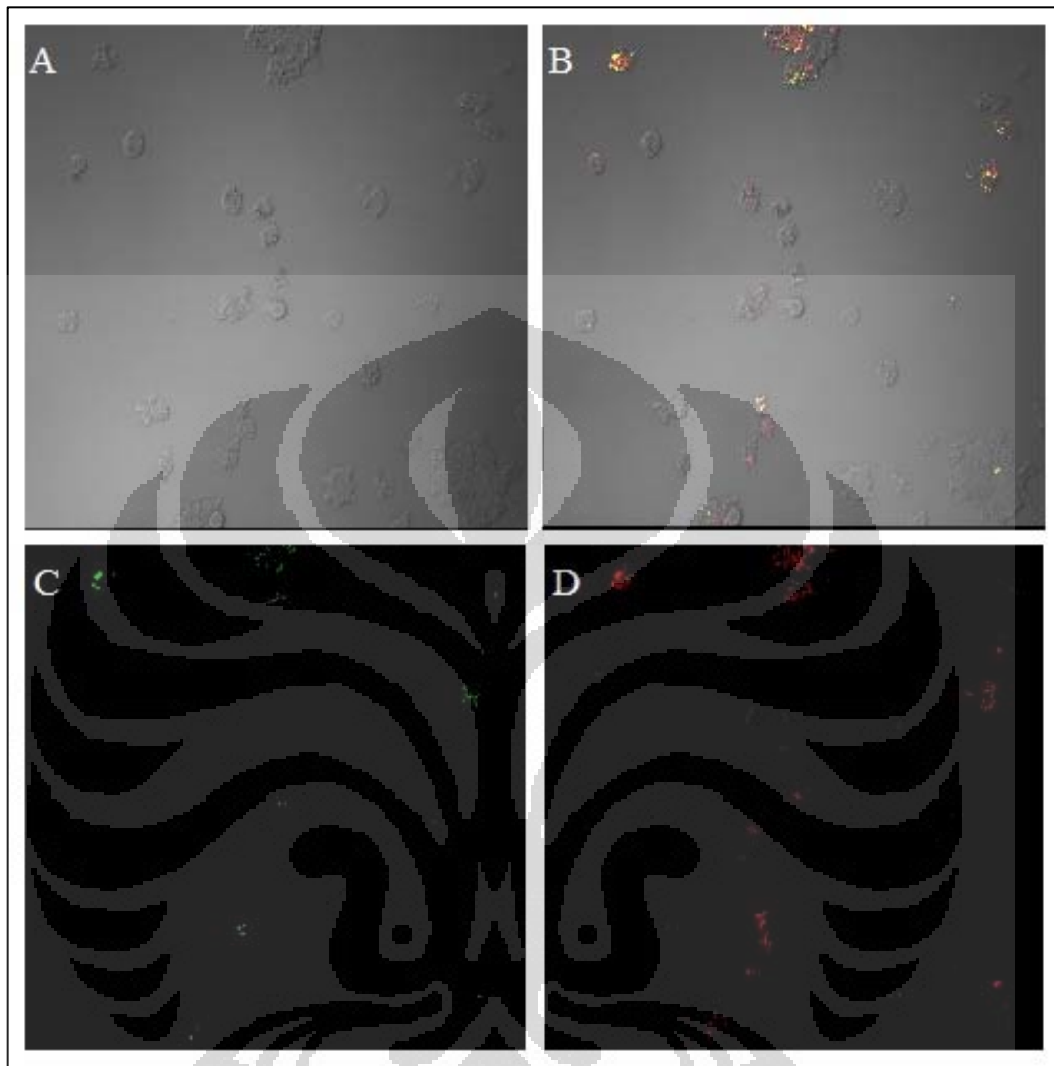
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

8) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua –
1



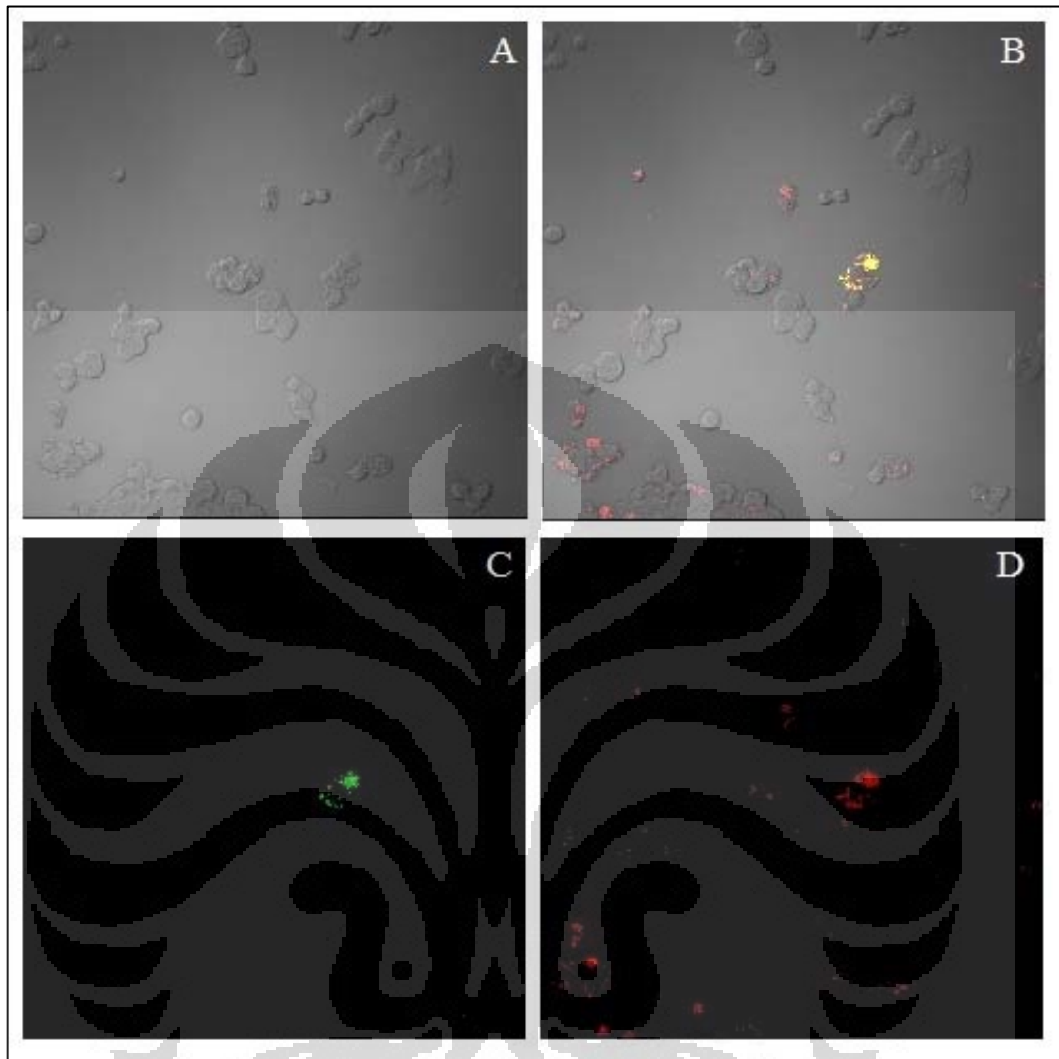
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

9) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua –
2



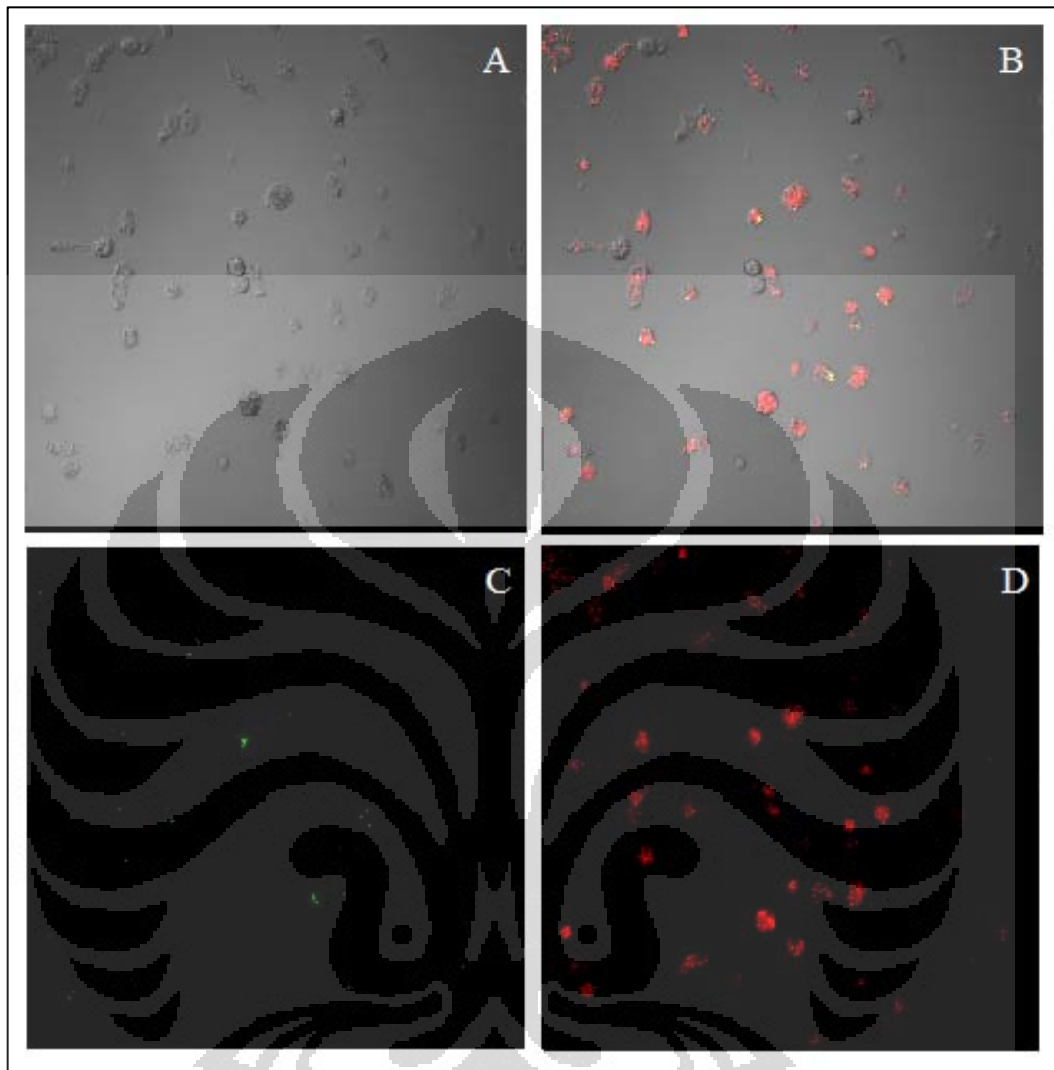
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

10) Sampel kontrol sel punca kanker payudara pada hari keempat – 1



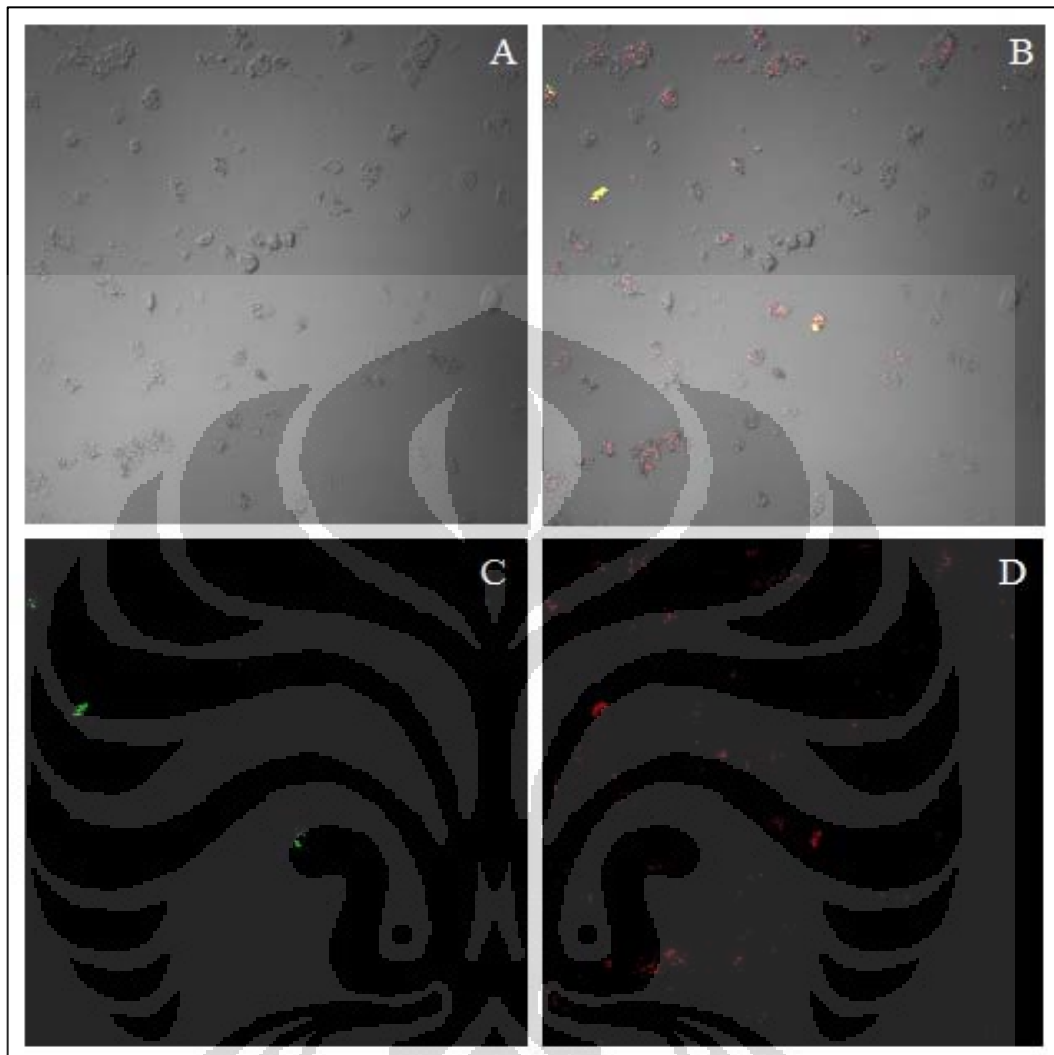
Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

11) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara dalam fibroblas normal hari keempat – 1



Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

12) Sampel ko-kultur sel punca kanker payudara dalam fibroblas kanker hari keempat – 1



Keterangan : A = foto sampel sel tanpa fluoresensi; B = foto sampel sel dengan *overlay* FITC dan PI; C = foto fluoresensi FITC; D = foto fluoresensi PI

Lampiran 6. Perhitungan analisis Annexin V- FITC dengan sitometer *Tali™* *Image-Based Cytometer* dengan fitur program "GFP/RFP"

1. Eksperimen pertama

No	Sampel	Hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
1	CSC	74%	0%	0%	26%
2	Kontrol-2	72%	4%	20%	4%
3	FN-2	65%	4%	20%	11%
4	FK-2	71%	1%	4%	24%
5	Kontrol-4	84%	9%	3%	4%
6	FN-4	31%	2%	35%	32%
7	FK-4	41%	3%	9%	47%

Keterangan : CSC = mamoser sel punca kanker payudara; Kontrol-2 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari kedua; FN-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua; FK-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua; Kontrol 4 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari keempat; FN-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari keempat; FK-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari keempat.

2. Eksperimen kedua

No	Sampel	Hidup	Apoptosis awal	Apoptosis akhir	Nekrosis
1	CSC	77%	0%	1%	22%
2	Kontrol-2	71%	3%	5%	21%
3	FN-2	41%	1%	3%	55%
4	FK-2	35%	1%	4%	60%
5	Kontrol-4	29%	1%	8%	62%
6	FN-4	4%	0%	9%	87%
7	FK-4	21%	0%	3%	76%

Keterangan : CSC = mamoser sel punca kanker payudara; Kontrol-2 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari kedua; FN-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua; FK-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua; Kontrol 4 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari keempat; FN-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari keempat; FK-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari keempat.

Lampiran 7. Perhitungan analisis Annexin V- FITC dengan mikroskop konvokal

No	Sampel	Tidak berfluoresensi	Annexin V- FITC ⁺ / PI ⁻	Annexin V- FITC ⁺ / PI ⁺	Annexin V- FITC ⁻ / PI ⁺	Total
1	CSC-1	15	-	2	4	21
2	CSC-2	18	-	-	11	29
3	Kontrol-2-1	17	-	-	-	17
4	Kontrol-2-2	13	-	1	1	15
5	Kontrol-2-3	7	-	7	4	18
6	FN-2-1	15	-	1	16	32
7	FN-2-2	4	2	7	5	18
8	FK-2-1	5	-	12	21	38
9	FK-2-2	-	-	1	11	12
10	Kontrol-4-1	12	1	4	33	50
11	FN-4-1	-	-	18	32	50
12	FK-4-1	4	-	3	43	50

Keterangan : CSC = mamoser sel punca kanker payudara; Kontrol-2 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari kedua; FN-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari kedua; FK-2 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari kedua; Kontrol 4 = kontrol sel punca kanker payudara tanpa feeder layer hari keempat; FN-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas normal hari keempat; FK-4 = ko-kultur sel punca kanker payudara pada fibroblas kanker hari keempat.

Lampiran 8. Keterangan kit Annexin V-FITC (Trevigen, USA)

TACS™ Annexin V-FITC

Apoptosis Detection Kits

Catalog Number: TA4638 - 100 tests

Catalog Number: TA5532 - 250 tests

This package insert must be read in its entirety before using this product.

**FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

(Lanjutan)

REAGENTS PROVIDED

Store components at 2 - 8° C in the dark.

Product Code	Description	Size
TA4638	Annexin V-FITC	100 Tests
4830-01-01	Annexin V-FITC (25 µg/mL)	100 µL
4830-01-02	10X Binding Buffer	5 mL
4830-01-03	Propidium Iodide (50 µg/mL)	1 mL
TA5532	Annexin V-FITC	250 Tests
4830-250-01	Annexin V-FITC (25 µg/mL)	250 µL
4830-250-02	10X Binding Buffer	20 mL
4830-250-03	Propidium Iodide (50 µg/mL)	2.5 mL

WARNINGS

Hazardous Ingredients

The acute and chronic effects of overexposure to reagents of this kit are unknown. Some kit reagents contain minute amounts of propidium iodide and other substances, which as concentrated solutions are poisonous and may be fatal if swallowed, absorbed through the skin, or inhaled. We recommend following the handling, emergency, and disposal procedures indicated below for all kit reagents.

Handling Precautions

Safe laboratory procedures should be followed when handling all kit reagents. It is recommended that protective laboratory clothing (gloves, laboratory coat, safety glasses) be worn when handling kit reagents.

Emergency Exposure Procedures

In case of exposure to reagent solutions, we recommend following these emergency first-aid procedures:

Skin or eye contact:

Wash with water for at least 15 minutes. Remove any contaminated clothes.

Inhalation:

Remove individual to fresh air. If breathing is difficult, give oxygen and call a physician.

Ingestion:

Rinse mouth with copious amounts of water and call a physician.

Reactivity Data

This kit contains propidium iodide, which is a carcinogen. Wear gloves, eye protection, and protective clothing when handling. Dispose of according to local regulations.

Lampiran 9. Keterangan kit *Quantikine[®] Human Cytochrome c immunoassay* (R&D System, USA)

Quantikine[®]

Human Cytochrome c Immunoassay

Catalog Number DCTC0
SCTC0
PDCTC0

For the quantitative determination of human cytochrome c concentrations in cell lysates.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

**FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

(Lanjutan)

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- If samples fall outside the dynamic range of the assay, further dilute the samples with Calibrator Diluent and repeat the assay.
- Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

MATERIALS PROVIDED

Description	Part #	Cat. # DCTC0	Cat. # SCTC0
Cytochrome c Microplate - 96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody against cytochrome c.	890070	1 plate	6 plates
Cytochrome c Conjugate - 21 mL/vial of monoclonal antibody against cytochrome c conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	890071	1 vial	6 vials
Cytochrome c Standard - 40 ng/vial of human cytochrome c in a buffered protein base with preservatives; lyophilized.	890072	1 vial	6 vials
Calibrator Diluent RD5P Concentrate - 21 mL/vial of a concentrated buffered protein base with preservatives.	895151	1 vial	6 vials
Cell Lysis Buffer 2 - 21 mL/vial of a buffered solution with preservative.	895347	2 vials	12 vials
Wash Buffer Concentrate - 21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservatives.	895003	1 vial	6 vials
Color Reagent A - 12.5 mL/vial of stabilized hydrogen peroxide.	895000	1 vial	6 vials
Color Reagent B - 12.5 mL/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	895001	1 vial	6 vials
Stop Solution - 6 mL/vial of 2 N sulfuric acid.	895032	1 vial	6 vials
Plate Covers - Adhesive strips.	—	4 strips	24 strips

DCTC0 contains sufficient materials to run an ELISA on one 96 well plate.

SCTC0 (SixPak) contains sufficient materials to run ELISAs on six 96 well plates.

This kit is also available in a PharmPak (R&D Systems, Catalog # PDCTC0). PharmPaks contain sufficient materials to run ELISAs on 50 microplates. Specific vial counts of each component may vary. Please refer to the literature accompanying your order for specific vial counts.

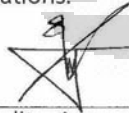
Lampiran 10. Spesifikasi alat Tali™ Based-Image Cytometer

Tali™ Image-Based Cytometer			
Catalog Number T10796			
Publication Part Number MAN0003766			
Revision Date 28 April 2011			
Specifications			
Physical characteristics	Instrument type:	Benchtop cell counter and suspension cell-based assay platform	
	Instrument dimensions:	11 ½" (W) × 11 ½" (H) × 17 ½" (D)	
	Weight:	19.4 lbs	
	Operating power:	100–240 VAC, 2.5 A, 120 V	
	Frequency:	50/60 Hz	
	Electrical input:	12 VDC, 13 A	
	Installation site:	Indoor use only	
	Operating temperature:	15–29°C	
	Operating humidity:	< 80% (non-condensing)	
	Technical specifications	Processing time:	10 seconds to 2 minutes, depending on the number of fields captured
Sample concentration range:		1×10^5 – 1×10^7 cells/mL	
Recommended sample diameter range:		5–60 µm	
Required sample volume:		25 µL	
Firmware:		Tali™ Image-Based Cytometer Firmware (visit www.invitrogen.com/tali for updates)	
USB Drive :		4 Gigabyte	
Optics		Optics:	3 channels (bright field, green fluorescence, red fluorescence)
		Excitation:	Green channel LED: 458 ± 20 nm Red channel LED: 530 ± 20 nm
		Filters:	Green channel: 466/40 EX, 495 LP Di, 525/50 EM Red channel: 543/22 EX, 580 LP Di, 585 LP EM
		Camera:	1.3 Mega pixels, 4X objective, 4X or 16X digital zoom
Tali™ Cellular Analysis Slide	Material:	Polylactic acid (PLA)	
	Dimensions:	110 mm (w) × 24 mm (d) × 1.9 mm (h)	
	Chamber volume:	25 µL	

Lampiran 11. Sertifikat analisis alat Tali™ Based-Image Cytometer

Tali™ image-based cytometer		Certificate of Analysis	
Product T10791	Descriptic Image-based cytometer	Serial: T110503-009	
Inspection	Final Result		
Outer Shell	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Powering and Power Button	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Software Functionality	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Stage Functionality	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
FAN	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Touch Screen	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Focus Knob	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
USB	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Firmware Version	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Date & Time Settings	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Image registration	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Image Alignment	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Image Final Quality	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Fluorescence Calibration GFP	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Fluorescence Calibration RFP	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	
Performance Tests	Pass <input checked="" type="checkbox"/>	Fail <input type="checkbox"/>	

This Certificate of Analysis asserts that the unit identified by the serial number noted above has been fully tested and met all its product specifications.



 Quality Approval

09.06.2011

 Release Date

invitrogen™
by life technologies

29851 Willow Creek Road • Eugene, Oregon 97402-9132 • p: +1 541 465 8390 • f: +1 541 344 6504 • www.invitrogen.com