

**IDENTIFIKASI EKSPRESI GEN MIOGLOBIN PADA
SEL PUNCA MESENKIMAL**

SKRIPSI

**Disusun untuk melengkapi syarat-syarat guna
memperoleh gelar Sarjana Sains**



**Intan Purnama Sari
3425102440**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2015**

ABSTRAK

INTAN PURNAMA SARI. IDENTIFIKASI EKSPRESI GEN MIOGLOBIN PADA SEL PUNCA MESENKIMAL. Skripsi. Program Studi Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. 2015.

Mioglobin (Mb) merupakan protein yang bertindak sebagai penyimpan oksigen untuk membantu menjaga persediaan oksigen jaringan, ditemukan dalam jumlah besar pada otot jantung dan otot rangka. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa mioglobin juga ditemukan ekspresinya di jaringan non muskuler, yaitu di paru tikus dan otak penyuh hijau pada keadaan normoksia. Hal tersebut melatar belakangi penelitian identifikasi ekspresi mioglobin pada sel punca mesenkimal, yaitu sel yang nantinya akan terdiferensiasi menjadi jaringan non muskuler. Metode penelitian ini adalah deskriptif menggunakan teknik *two step* RT-PCR dan metode *Taqman Probe* untuk mengidentifikasi ekspresi gen target mioglobin dan gen HIF (*Hypoxia include factor*) sebagai penanda keadaan oksigen pada sampel dan *Housekeeping Gene* Betha Actin sebagai kontrol teknik pekerjaan. Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret- Mei 2015 di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi, FMIPA - UNJ dan Laboratorium Biologi Oral FKG - UI. Gen mioglobin, HIF, dan Betha actin terekspresi pada sel punca mesenkimal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen mioglobin terekspresi pada sel punca mesenkimal hasil preservasi *cryogenik deep freezer* -80 °C disertai dengan ekspresi gen HIF 1 α yang menunjukkan bahwa sel punca mesenkimal berada pada keadaan hipoksia.

Kata Kunci: Mioglobin, *two step* RT-PCR, *Taqman Probe*, HIF, Betha Actin

ABSTRACT

INTAN PURNAMA SARI. EXPRESSION IDENTIFICATION OF MYOGLOBIN GENE ON MESENCHYMAL STEM CELLS. Thesis. A course of study Biology. Major Biology. Mathematics and Natural Science Faculty. University of Jakarta. 2015.

Myoglobin is a protein that act as the depositary of oxygen to help maintain the supply of oxygen for the tissue, found in large numbers upon the cardiac muscle and skeletal muscles. Recent study shows that myoglobin also found its expression in non-muscular tissue, in pulmonary of rat and green turtles brains on normoksia circumstances. It triggered the study to indentify the expression of Myoglobin on the stem cell that will be differentiated become non-muscular tissue. The research methodology was descriptive with *two step* RT-PCR technic and *Taqman Probe* method to identify the Myoglobin expression gene target and HIF gene (*Hypoxia include factor*) as the oxygen indicator on the sample and Housekeeping Gene Betha Actinas controlling for technical of the study. The study was held on March - May 2015 at Biochemistry Laboratory – Biology University of Jakarta and Laboratory Biology Oral FKG University of Indonesia. Myoglobin gene, HIF, and Betha actin be expressed on stem cell. The results showed that the myoglobin gene expressed in mesenchymal stem cells preservation results cryogenic deep freezer -80 ° C accompanied by the expression of HIF-1 α gene which indicates that the mesenchymal stem cells that are in a state of hypoxia.

Keywords: Myoglobin, two step RT-PCR, Taqman Probe, HIF, Betha Actin

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'alamiin. Puji syukur kepada Allah SWT dan shalawat kepada Rasul-Nya atas selesainya skripsi yang berjudul "**Identifikasi Ekspresi Gen Mioglobin Pada Sel PuncaMesenkimal**" sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Jakarta. Penulis menyadari bahwa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak baik moril maupun materil, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini sangatlah memberi dorongan besar bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan baik moral, doa dan materil, di antaranya :

1. Dr. Rini Puspitaningrum, M.Biomed selaku pembimbing I dan Chris Adhiyanto, M.Biomed., PhD dari UIN Syarif Hidayatullah Jakarta selaku Pembimbing II yang dengan penuh kesabaran membimbing, memberi saran dan bantuan selama penyusunan skripsi hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Rusdi, M.Biomed selaku Penguji I dan Dra. Muzajjanah, M.Kes selaku Penguji II yang telah memberikan masukan dan saran kepada penulis dalam penulisan skripsi ini.

3. Drs. M. Nurdin Matondang S, M. Si selaku Ketua Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Jakarta yang telah memberikan arahan dan saran.
4. Eka Putri Azrai, S. Pd., M. Si selaku ketua Program Studi Biologi FMIPA, Universitas Negeri Jakarta yang telah memberikan saran dan dukungan.
5. Dra. Mieke Miarsyah, M. Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menjadi mahasiswa di Jurusan Biologi.
6. Para dosen Jurusan Biologi UNJ yang telah memberikan sumbangsih ilmu kepada penulis selama masa perkuliahan.
7. Papa dan Mama terhebat dan tercinta, Abu dan Siti Soleha yang telah membesarkan, selalu membimbing dan mendoakan setiap saat serta dukungan baik dukungan moral, materil, hingga bantuan doa demi kelancaran penelitian ini. Kakak dan adikku tersayang Mas Ai, Mas Agus, Mba Ajeng, Mas Andri, Miranti, dan Safitri untuk doa dan semangat yang diberikan selama ini. Kalian adalah penyemangat terhebat.
8. Teman-teman tersayang Fitri, Monika, Nurliya, Wiena, dan Resha yang telah membantu dan mendoakan penulis dalam menyelesaikan penelitian. Sukses buat kalian.
9. Teman-teman Biologi Reguler angkatan 2010 yang selalu menghibur dan menjadi bagian hidup penulis selama perkuliahan.

10. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian skripsi ini dan tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Besar harapan penulis agar skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi siapa saja yang membacanya.

Jakarta, Juli 2015

IntanPurnama Sari

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	I
KATA PENGANTAR	lii
DAFTAR ISI	Vi
DAFTAR GAMBAR	Ix
DAFTAR TABEL	X
DAFTAR LAMPIRAN.....	Xi
BAB I PENDAHULUAN	
A.Latar Belakang	1
B.Perumusan Masalah	4
C.Tujuan Penelitian	4
D.Manfaat Penelitian	5
BAB II KAJIAN PUSTAKA dan KERANGKA BERPIKIR	
A.Kajian Pustaka	6
1. Mioglobin	6
2. Fungsi Mioglobin.....	8
3. Sel Mesenkim	8
4. Sel Punca.....	9
5. Embrio Stem Sel (ESCs).....	10
6. Germ Stem Cell	11
7. Adult Stem Cell.....	11
8. HIF (<i>Hypoxia Induce Factor</i>).....	12
9. Betha Actin.....	13
10.Complementary DNA (cDNA).....	14
11. <i>Metode Taqman Probes</i>	15
B. Kerangka Berfikir	19

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

A.Tujuan Operasional	22
B.Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
C.Sampel	22
D.Metode Penelitian.....	23
E. Prosedur Penelitian.....	23
1. Alat dan bahan.....	23
2. Cara kerja	23
a. Isolasi RNA dari Sel Punca Mesenkim.....	23
b. Amplifikasi RNA menjadi cDNA menggunakan High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.....	25
c. Analisis molekul mRNA menggunakan spektrofotometri.....	26
d. Deteksi mioglobin dengan Taqman Probes.....	26
F.Teknik Pengumpulan Data.....	27
G. Alur Penelitian.....	27

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian	
1. Hasil Desain Probe.....	28
2. Hasil isolasi mRNA dari sel Punca Mesenkimal	29
3. Hasil Amplifikasi mRNA menjadi cDNA.....	30
4. Hasil Uji teknik <i>two step</i> RT-PCR untuk ekspresi gen Mioglobin, HIF, dan Betha Actin pada sel punca mesenkimal.....	31
a. Amplifikasi sampel A1, A2, B1, B2 cDNA sel punca mesenkimal.....	31
B. Pembahasan	
1. Molekul mRNA dan cDNA hasil isolasi sel punca mesenkimal	36

2. Amplifikasi ekspresi gen mioglobin, HIF 1 alfa dan betha actin sel punca mesenkimal dengan teknik <i>two step</i> RT-PCR.....	38
3. Ekspresi gen mioglobin sel punca mesenkimal.....	41
4. Ekspresi gen betha actin dengan tetknik <i>two step</i> RT-PCR.....	43
BAB V KESIMPULAN, IMPLIKASI DAN SARAN	
A.Kesimpulan	44
B. Implikasi	44
C.Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN.....	51
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	55
RIWAYAT HIDUP	56

DAFTAR GAMBAR

No	Halaman
1. Struktur Mioglobin	7
2. Posisi gen betha actin pada kromosom manusia pada cytogenik 7p22.1.....	14
3. Prinsip Kerja Taqman Probe (Yuan <i>et al</i> , 2000)	16
4. Analisis hasil amplifikasi dengan menggunakan Real Time PCR.....	18
5. Hasil amplifikasi ekspresi gen Mioglobin, HIF dan Betha Actin pada sampel sel punca mesenkimal yaitu A1, A2, B1, dan B2 dengan komposisi cDNA sebanyak 2 μ L berdasarkan protokol <i>Taqman Fast Advance Master Mix Product Insert</i> (Lampiran 1) dengan menggunakan teknik dan program <i>two step</i> RT- PCR.....	33
6. Hasil Amplifikasi Gen Mioglobin dengan Teknik dan program <i>two step</i> RT-PCR	34
7. Hasil amplifikasi ekspresi gen HIF 1 α sel punca mesenkimal pada sampel A1 dan A2 hasil preservasi <i>cryogenik deep freezer</i> -80°C dengan menggunakan teknik dan program <i>two step</i> RT-PCR.....	35
8. Hasil amplifikasi ekspresi gen betha actin sel punca mesenkimal pada sampel A1, A2, B1, dan B2 dengan menggunakan teknik dan program <i>two step</i> RT-PCR.....	36

DAFTAR TABEL

No		Halaman
1.	Komposisi formulasi campuran bahan untuk proses PCR Amplifikasi mRNA menjadi cDNA.....	25
2.	Komposisi formulasi campuran bahan <i>two step Real Time</i> PCR untuk mengamplifikasi gen Mioglobin, HIF 1 α , dan Betha Actin.....	26
3.	Sumber perolehan sampel sel punca mesenkimal tali pusat dari lab UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca.....	29
4.	Data nilai kemurnian dan konsentrasi mRNA.....	30
5.	Program PCR : untuk mengubah molekul mRNA menjadi cDNA.....	31
6.	Program <i>two step</i> RT-PCR untuk hasil analisis optimum.....	31

DAFTAR LAMPIRAN

No		Halaman
1.	Protokol formulasi campuran bahan <i>two stepReal Time</i> PCR.....	51
2.	Tanda bukti penerimaan sel punca mesenkimal tali pusat dari UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM.....	52
3.	Prosedur Penelitian.....	53

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Mioglobin (Mb) adalah protein yang bertindak sebagai penyimpan oksigen untuk membantu menjaga persediaan oksigen jaringan. Austen dan Thomas menjelaskan bahwa konsentrasi Mb tertinggi terdapat pada otot rangka mamalia air dan meningkat konsentrasinya pada hewan dan manusia setelah terjadi hipoksia. Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen di dalam sel atau jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup sel (Septelia *et al.*, 2009).

Telah ditemukan bahwa mioglobin ternyata ekspresinya terdistribusi di paru tikus dan otak penyu hijau pada keadaan normoksia (Puspitaningrum, *et al.*, 2010). Normoksia adalah kondisi dimana level oksigen jaringan/sel berada dalam keadaan normal (Mckeown, 2013). Hasil tersebut adalah satu informasi baru yang menambahkan penguatan hasil temuan Fraser, *et al* tahun 2006 tentang temuan yang sangat mengejutkan tentang ekspresi mioglobin pada ikan mas hipoksik.

Ditemukannya ekspresi mioglobin selain di otot jantung dan otot rangka masih menjadi perdebatan dikalangan peneliti mioglobin di dunia. Apakah benar mioglobin terekspresi di jaringan non muskuler, apakah ekspresi mioglobin merupakan indikasi mekanisme adaptif sel terhadap lingkungannya, atau apakah mioglobin merupakan protein

konstitutif(selalu tersedia). Oleh karena itu, untuk menjawab semua pertanyaan tersebut dirancang serangkaian penelitian untuk mendapatkan informasi bagaimana sesungguhnya mekanisme dan regulasi ekspresi gen mioglobin dalam sel/jaringan. Pada penelitian ini digunakan sel punca mesenkimal sebagai sampel penelitian.

Sel Punca adalah sel mampu memperbaharui diri sendiri dan memicu diferensiasi sel (Till dan McCulloch, 1961). Sel punca ditemukan di berbagai sumber seperti embrio, sumsum tulang, darah, kornea dan retina mata, otak, otot rangka, pulpa gigi, hati, kulit, lapisan saluran pencernaan, dan pankreas. Meskipun pembaruan diri dan diferensiasi menjadi bentuk sel-sel lain yang umum; sel punca sangat bervariasi dalam potensi untuk berdiferensiasi (Morrison, *et al.*, 1997).

Sel induk/sel punca merupakan sel-sel yang ditemukan pada organisme multiselular, yang dapat membelah melalui mitosis dan berdiferensiasi menjadi jenis sel khusus yang beragam dan dapat memperbaharui diri untuk menghasilkan sel-sel lain (Helianti, 2013). Pada mamalia, ada dua jenis sel induk: sel induk embrionik, yang terisolasi dari massa sel bagian dalam blastokista, dan sel induk dewasa (*adult cell*), yang ditemukan dalam berbagai jaringan. Pada organisme dewasa, sel induk bertindak sebagai sistem perbaikan untuk tubuh dan perbaikan jaringan yang rusak. Pada sel induk embrio, sel induk tersebut dapat berdiferensiasi menjadi semua sel-sel khusus (disebut sel *multipotent*). (Takahashi, 2007).

Sel punca mesenkimal (MSCs) merupakan sumber sel punca yang yaitu dapat memperbaharui diri dan bersifat *multipotent*. *Human umbilical cord* (HUC) atau tali pusat yang berasal dari embrio adalah membran ekstra embrio dan *Whartons Jelly* berada dalam plasenta yang merupakan sumber sel punca. *Whartons jelly* memiliki keunikan yaitu laju poliferasi yang tinggi, *multipotent*, hipoimunogenitas, tidak menyebabkan teratoma dan memiliki sifat anti kanker, sehingga dapat bermanfaat untuk terapi. Selama lebih dari 30 tahun, sel punca dari sumsum tulang dan tali pusat, telah digunakan untuk mengobati pasien kanker seperti leukemia dan limfoma.

Pemilihan sel punca normoksia sebagai objek penelitian ini sekaligus memberi harapan baru untuk membuka cara pandang terhadap keberadaan dan fungsi penting protein mioglobin sesungguhnya di dalam tubuh. Hasil penelitian ini akan menggambarkan bagaimana sel punca normoksik ini menjaga homeostasis oksigennya di dalam sel yang diamati melalui ekspresi gen mioglobin. Implementasi hasil penelitian ini adalah memberikan pemahaman penting tentang mekanisme respon protektif dan adaptif tubuh terhadap lingkungannya.

Deteksi gen target mioglobin pada sel punca menggunakan metode *two step* Real Time PCR. Teknik penelitian ini menggunakan gen betha actin. Betha actin adalah *housekeepinggene* yang berperan sebagai kontrol teknik lab dalam penelitian ini (Sahela, *et al.*, 2010). HIF (*Hypoxia Induce Factor*) adalah gen yang digunakan untuk mengetahui kondisi sel

punca, keberadaan ekspresi gen HIF ini berguna untuk mengidentifikasi apakah sel punca tersebut dalam kondisi hipoksia atau tidak (Masagus dan Lutfah, 2013).

Beberapa efek hipoksia pada fungsi sel punca secara langsung dimediasi oleh HIF (Keith,*et al.*, 2007.). Baru-baru ini, mekanisme molekuler baru dimana HIF langsung mengubah diferensiasi selular dan fungsi sel punca sudah ditetapkan. HIF berperan dalam mekanisme molekuler yang spesifik dimana respon oksigen dapat menghambat diferensiasi sel punca.

B. Rumusan Masalah

Apakah sel punca mesenkimal mengekspresikan gen mioglobin?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui apakah sel punca mesenkimal mengekspresikan gen mioglobin.
2. Mengidentifikasi gen HIF 1 α (*Hypoxia Induce Factor*) pada sel punca mesenkimal dalam preservasi *cryogenik deep freezer* - 80°C.
3. Mengidentifikasi gen Betha Actin sebagai kontrol teknik pada sel punca mesenkimal.

D. Manfaat Penelitian

1. Dapat mengetahui ekspresi gen mioglobin pada sel punca mesenkimal.
2. Dapat mengetahui pengaruh HIF (*Hypoxia Induce Factor*) terhadap ekspresi gen mioglobin pada sel punca mesenkimal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN KERANGKA BERFIKIR

A. Kajian Pustaka

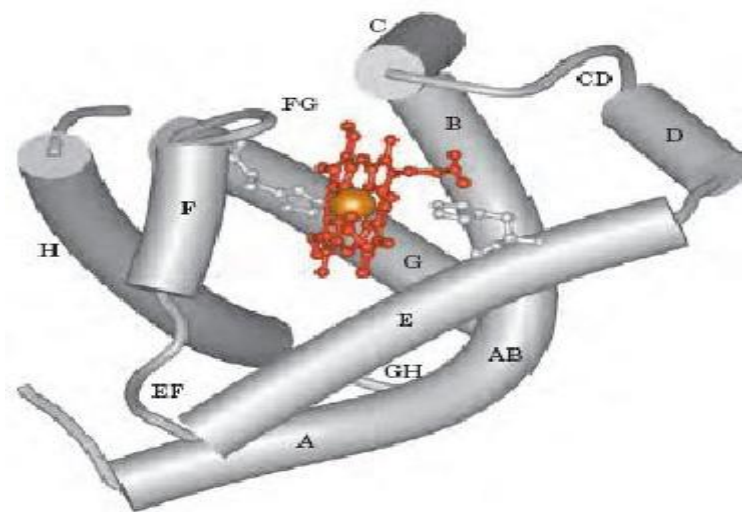
1. Mioglobin

Mioglobin (BM 16700, disingkat Mb) merupakan protein pengikat oksigen yang relatif sederhana, ditemukan dalam konsentrasi yang besar pada tulang dan otot jantung, membuat jaringan ini berwarna merah yang berfungsi sebagai penyimpan oksigen dan sebagai pembawa oksigen yang meningkatkan laju transpor oksigen dalam sel otot (Nelson dan Cox, 2005). Mioglobin berfungsi sebagai pengangkut oksigen dalam menanggapi permintaan oksigen dari mitokondria dan mengangkut mitokondria dari sarkolemma menuju jantung dan sel-sel otot (Jonathan, *et al.*, 2003).

Protein seperti mioglobin juga banyak ditemukan pada organisme sel tunggal. Mioglobin merupakan polipeptida tunggal dengan 153 residu asam amino dan satu molekul heme. Komponen protein dari Mioglobin yang disebut globin, merupakan rantai polipeptida tunggal yang berisi delapan α -heliks. Sekitar 78% residu asam amino dari protein ditemukan dalam α -heliks ini (Nelson dan Cox, 2005).

Protein mioglobin diikat oleh satu gugus heme yang terletak pada bagian hidrofobik. Pengikatan heme pada mioglobin berfungsi untuk mengikat oksigen. Heme terdiri dari cincin protoporfirin yang mengelilingi

atom besi. Atom besi tersebut diikat oleh 4 gugus nitrogen yang terdapat pada protoporfirin. Bagian interior dari mioglobin terbentuk dari gugus samping hidrofobik, sedangkan eksterior terbuat dari gugus samping hidrofilik (Arkhipov, *et al.*, 2008).



Gambar 1. Struktur Mioglobin

Struktur utama mioglobin pada otot rangka dan jaringan otot jantung tidak terdapat perbedaan. Mioglobin bukan merupakan suatu penyebab kerusakan pada otot jantung, karena otot rangka mengeluarkan mioglobin yang akan dirubah menjadi serum yang akan digunakan untuk penyembuhan cedera otot jantung (Romero dan Lehman, 1974). Hal ini dibuktikan bahwa peningkatan serum mioglobin tidak meningkatkan AMI (*acute myocardial infarction*). Tetapi serum mioglobin tetap sebagai analit karena sensitivitasnya dan sebagai protein yang dilepaskan lebih cepat dari protein yang lain. Oleh karena itu, mioglobin sering dijadikan

sebagai penanda untuk mendiagnosis penyakit dan dalam prognosis AMI5-10 (Giblet, *et al.*,1987).

2. Fungsi Mioglobin

Mioglobin merupakan hemoprotein yang berkontribusi dalam penyimpanan oksigen intraseluler dan memfasilitasi difusi oksigen seluler (Meyer, 2004). Saat oksigen cukup tersedia, mioglobin akan mengikat oksigen dengan afinitas yang tinggi dan pada saat oksigen rendah mioglobin akan melepaskan oksigen dan membawa oksigen ke mitokondria, dengan demikian mioglobin juga berperan dalam homeostasis oksigen (Postnikova,*et al.*, 2013). Selain itu mioglobin juga merupakan *scavenging* nitrogen oksida (NO) (Husnil, 2012).

3. Sel Mesemkimal

Sel *mesenchymal* (MSC) pertama kali diisolasi pada tahun 1966 oleh Friedanstein, *et al.*, dari sumsum tulang belakang. Friedanstein juga menemukan bahwa MSC merupakan sel progenitor multilineage dengan kemampuan berdiferensiasi dan berkembang biak secara *in vitro*. *The International Society for Seluler Terapi* (ISCT) menerapkan kriteria umum untuk menentukan MSC, yaitu morfologi seperti fibroblast, berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit, dan kondroblast:ekspresi positif CD105, CD73 dan CD90; ekspresi negatif CD45, CD34, D14 atau CD11b, CD79alpha atau CD19, dan HLA-DR. MSC memiliki sifat imunomodulator yang mempengaruhi varietas populasi sel imun (Hui Yun,*et al.*,2014).

Sel mesenkimal terdapat pada semua jaringan seperti di sumsum tulang belakang, jaringan adiposa, ligamen periodontal, membran sinovial, dan otot serta pada jaringan janin seperti plasenta cairan amnion dan tali pusat. Sel mesenkimal dapat mempengaruhi perkembangan seluler yang dilakukan secara *in vivo* sebagai agen terapeutik (Orbay, *et al.*, 2012). Sel mesenkimal dapat berdiferensiasi menjadi miosit dan kardiomiosit dan bahkan ke dalam sel yang bukan berasal dari mesoderm, termasuk hepatosit, sel yang memproduksi insulin, dan neuron (Jiang, *et al.*, 2002).

4. Sel Punca

Sel punca didefinisikan sebagai sel yang belum berdiferensiasi sehingga memiliki potensi untuk memperbanyak diri dan tumbuh menjadi sel tertentu. Beberapa terminologi yang digunakan untuk menjelaskan karakteristik berbagai jenis sel punca (Du, *et al.*, 2009):

- a) Sel punca *totipotent*: memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadiseluruh sel dan jaringan yang membangun embrio dan mendukungperkembangan fetus, misalnya zigot atau ovum yang dibuahi
- b) Sel punca *pluripotent*: memiliki potensial untuk berkembang menjadi sel yangberasal dari ketiga lapisan germinal, misalnya sel punca embrionik.
- c) Sel punca *multipotent*: memiliki kemampuan menghasilkan sejumlah sel spesifik yang berdiferensiasi sesuai tempatnya, misalnya sel punca somatikatau sel punca dewasa.

- d) Sel punca *unipotent*: memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi satu jenis sel, misalnya sel punca epidermal (Du, *et al.*, 2009).

Sel punca bertanggung jawab dalam pertumbuhan, homeostasis dan perbaikan berbagai jaringan. Pada jaringan dewasa normal, sel punca dikontrol dengan integrasi faktor intrinsik (misalnya faktor inti sel) dan faktor ekstrinsik (melalui *growth factor*, stroma dan pengaruh lainnya) (Parte, *et al.*, 2011).

Sel punca dapat diklasifikasikan karena sumber asal sel tersebut dan potensinya untuk membedakan dengan jenis sel lainnya. Ada tiga jenis utama dari sel punca: *Embryo Stem Cells* (ESCs), *Germ Stem Cells* (GSCs), dan *Adult Stem Cells* (ASCs) (Takahashi and Yamanka, 2006).

5. Embryo Stem Sel (ESCs)

Embryo stem cells pertama kali diisolasi dari massa sel permulaan dalam sel tikus pada tahun 1981 oleh Kaufman dan Martin, dan dari manusia pada tahun 1998 oleh Thomson, *et al.* *Embryo stem cells* dapat membentuk sel-sel dari ketiga *germ layer* dan melakukan pembelahan dengan jumlah yang tidak terbatas pada pembelahan secara simetris tanpa diferensiasi secara *in vitro* (Burdon, *et al.* 2002). *Embryo stem cells* memiliki aktivitas telomerase yang tinggi, yang menambahkan telomer sampai ke ujung kromosom (Armstrong, *et al.*, 2000). *Embryo Stem Cells* tidak memerlukan stimulus eksternal untuk memulai replikasi DNA (Burdon, *et al.* 2002).

Embryo stem cells ketika disuntikkan ke tikus imunodefisiensi dapat membentuk tumor. Hal ini menunjukkan bahwa karena potensi diferensiasi yang tinggi, sel tersebut dapat membentuk semua jenis sel sehingga, proses pembelahan harus dikontrol dan semua faktor yang mempengaruhi diferensiasi ESCs harus diketahui sebelum menggunakan sel tersebut dalam aplikasi klinis (Gültekin, 2009). *Embryo stem cells* berpotensi menimbulkan penolakan kekebalan, dan kendala lain. *Embryo stem cells* tidak dapat digunakan dalam aplikasi terapi.

6. Germ Stem Cells (GSCs)

Johnson, *et al* (2004) melaporkan bahwa epitel permukaan ovarium merupakan sumber sel punca germinal yang berproliferasi dan mampu memperbaiki proses folikulogenesis postnatal. *Germline stem cells* (GSCs) ditemukan pada organisme yang terus-menerus memproduksi sperma dan telur sampai mereka steril. Sel punca yang berspesialisasi ini terletak di *GSC niche*, yakni lokasi awal untuk produksi gamet, yang terdiri dari GSCs, *stem cells* somatik, dan sel somatik lain.

7. Adult Stem Cells (ASCs)

Adult stem cells ditemukan di jaringan dan organ, dan peran utama sel tersebut adalah untuk mempertahankan homeostasis (Serakinci dan Keith, 2006). *Adult stem cells* kebanyakan ditemukan dalam sumsum tulang, darah, kornea dan retina mata, otak, otot rangka, pulpa gigi, hati, kulit, lapisan saluran pencernaan, dan pankreas. *Adult stem cells* tersebar seluruh jaringan organisme yang sudah dewasa dan memiliki peran yang

sangat berbeda tergantung pada lingkungan. *Adult stem cells* juga dapat membentuk jenis sel dari khusus yang dikenal sebagai plastisitas (Horwitz, 2003). Jika mekanisme bawah plastisitas sel punca dewasa dapat diidentifikasi dan dikendalikan, maka dapat digunakan dalam perbaikan jaringan yang rusak. *Adult stem cells* yang paling sering diteliti adalah HSCS, MSC, sel punca saraf, sel punca epitel, dan sel punca kulit. HSCS ditemukan dalam sel darah merah, limfosit B, limfosit T, neutrofil, basofil, eosinofil, monosit, makrofag, dan trombosit. Sel mesenkimal (MSC) ditemukan pada osteosit, kondrosit, adiposit, dan jenis lain dari sel-sel jaringan ikat seperti yang di tendon.

Adult stem cells dapat digunakan untuk menggantikan jaringan rusak atau hancur. *Adult Stem Cells* juga dapat pengobatan potensial di masa depan untuk berbagai penyakit seperti gangguan jantung, diabetes, penyakit Alzheimer dan banyak lainnya (Horwitz, 2003).

8. HIF (*hypoxia Induce Factor*)

Ketersediaan oksigen yang tidak memadai dapat mengakibatkan disfungsi seluler dan jika keadaan ini berlanjut maka akan menyebabkan kematian sel pada organisme (William, *et al.*, 2008). Rendahnya tingkat oksigen dalam jaringan (hipoksia) muncul sebagai konsekuensi dari sejumlah kondisi patofisiologi karena suplai oksigen berkurang akibat pembuluh darah yang rusak. Kondisi tersebut meliputi gangguan iskemik yang akan mengakibatkan penyakit diabetes, aterosklerosis, penyakit

inflamasi, pre-eklampsia, penyakit paru obstruktif kronik, dan kanker (Brahimi-Horn dan Pouyssegur, 2007).

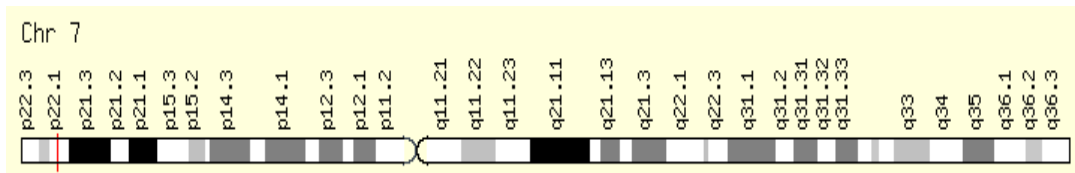
Pada tingkat molekuler, sel-sel memiliki kemampuan untuk mendeteksi ketersediaan oksigen dan dengan demikian mengalami perubahan adaptif dalam ekspresi gen yang meningkatkan pengiriman oksigen. Faktor transkripsi yang disebut faktor *Hypoxia Induce Factor* (HIF) memainkan peran penting dalam proses ini (Kaelin dan Ratcliffe, 2008).

Molekul HIF-1 merupakan heterodimer yang terdiri dari sub unit α dan sub unit β yang dikenal sebagai ARNT (*ary hydrocarbon nuclear translocator*). Sub unit β (HIF-1 β) terdapat di dalam inti sel dan diekspresikan secara konstitutif. Oleh karena itu aktivitasnya tidak dipengaruhi kondisi hipoksia. Sedangkan sub unit α (HIF-1 α) yang diinduksi secara khusus sebagai respons adaptasi terhadap keadaan hipoksia, dipercaya sebagai regulator utama homeostasis oksigen. Stabilitas dan aktivitas sub unit α sangat dipengaruhi oleh kadar oksigen dan diatur oleh beberapa modifikasi pasca translasi (Lee, *et al.*, 2004).

9. Betha Actin

Gen actin termasuk *housekeeping gene* yaitu gen yang memiliki tingkat ekspresi yang stabil di berbagai jaringan pada semua tahapan perkembangan. Sifat gen yang seperti ini menjadikan gen aktin digunakan

sebagai kontrol internal pada analisis ekspresi, khususnya analisis ekspresi gen dengan metode qRT-PCR (*quantitative reverse transcriptase polymorphisme chain reaction*).



Gambar 2. Posisi gen betha actin pada kromosom manusia pada cytogenik 7p22.1.

Housekeeping gene digunakan dalam penelitian untuk mengukur potensi terjadi kesalahan pada RNA/cDNA yang digunakan dalam sebuah penelitian. *Hosekeeping gene* yang ideal harus stabil di jaringan yang berbeda, tahap perkembangan, dan kondisi eksperimental pada sampel penelitian yang digunakan. Macam-macam *housekeeping gene* yang dapat digunakan dalam RT-PCR yaitu ACTB, GAPDH, 18S rRNA, ATP5B dan ATP5G1 (Kuchipudi, *et al.*, 2012).

10. Complementary DNA (cDNA)

Complementary DNA (cDNA) ini dapat pula digunakan untuk keperluan deteksi ekspresi gen eukariot dalam sel prokariot (Nicholl, 2002). Molekul cDNA diperoleh dari penyalinan mRNA yang sudah tidak memiliki daerah intron pada urutan basa nukleotidanya. Daerah intron dapat mencegah ekspresi gen eukariot pada sel prokariot. Sel prokariot tidak memiliki perangkat untuk memotong daerah intron. Oleh karena itu,

cDNA banyak digunakan sebagai sumber DNA pada proses pengklonan maupun deteksi ekspresi gen (Nicholl, 2002).

11. Metode *Taqman Probes*

Real-time PCR atau *quantitative* PCR (qPCR) merupakan salah satu modifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dimana proses perbanyakan dan analisis kuantitatif ampikon/molekul DNA target dilakukan secara bersamaan. *Real Time* PCR merupakan variasi dari teknik standar PCR yang digunakan untuk mengkuantifikasi sampel DNA atau RNA. Pada *Real Time* PCR, jumlah DNA dihitung pada setiap siklus menggunakan penanda berfluoresensi yang menempel pada produk PCR. Peningkatan sinyal fluoresensi berbanding lurus dengan jumlah produk PCR yang dihasilkan pada fase eksponensial. *Real Time* PCR lebih efektif dibandingkan dengan PCR konvensional. Pada PCR konvensional, jumlah produk PCR/ ampikon dihitung setelah proses PCR berakhir. Hal tersebut kurang efektif, karena proses PCR bisa saja tidak berada pada fase eksponensial atau berada pada kondisi optimum saat di beberapa siklus pertama, akibatnya perhitungan menjadi tidak valid. Sedangkan pada *Real-time* PCR, jumlah produk PCR dapat dihitung pada setiap siklus, sehingga perhitungannya lebih akurat (Siew Leng, *et al.*, 2013).

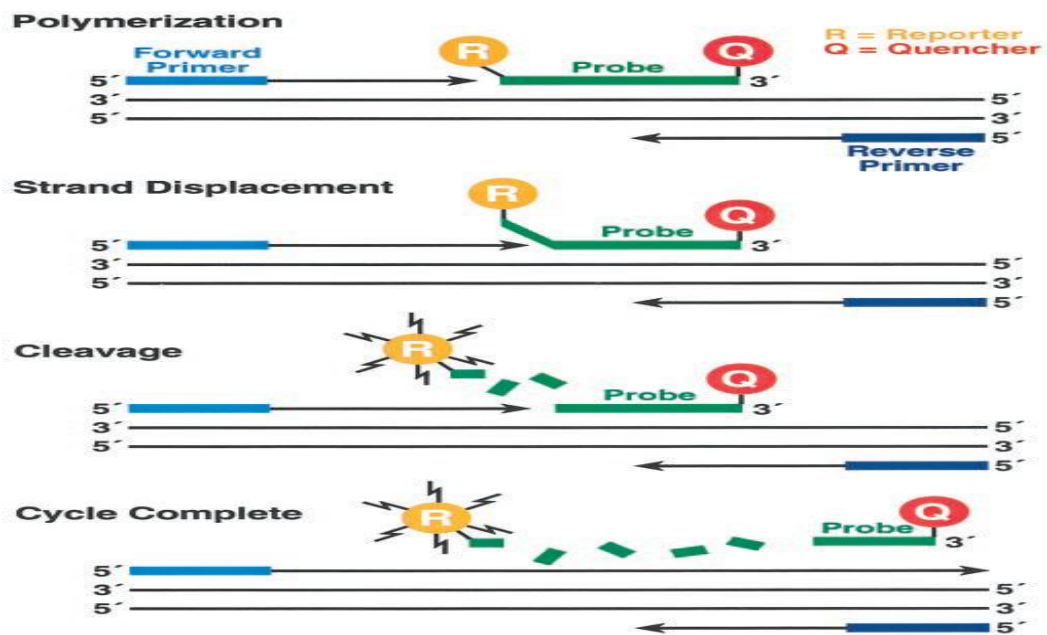
Salah satu metode yang menggunakan pada *Real Time* PCR untuk mendeteksi adanya mutasi adalah teknik *Fluorescent Hybridization Taqman Probes*. Metode tersebut menggunakan DNA *probe* yang telah dilabel dengan suatu penanda yang dapat berfluoresensi. DNA *probe* yang

telah dilabel akan berkomplementasi dengan DNA target melalui hibridisasi sehingga dapat mendeteksi keberadaan gen tertentu. *Probe* sangat sensitif dalam mendeteksi DNA atau molekul target. *Probe* dirancang untuk berikatan dengan DNA target hasil amplifikasi (Siew Leng, *et al.*, 2013).

Probe yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Probe TaqMan*. *Probe* tersebut memiliki *fluorescent reporter* (pemancar sinar fluoresen) pada ujung 5' dan *quencher dye* (pemadam sinar) pada ujung 3'. *Fluorescent reporter* selalu memancarkan sinar. Selama *probe* belum berikatan dengan DNA target atau *probe* tidak dapat berikatan dengan DNA target, maka sinar yang dipancarkan oleh *fluorescent reporter* diredam oleh *quencher dye*. Jika *probe* telah menempel/berhibridisasi dengan DNA target, maka *probe* akan dipotong atau diuraikan oleh aktivitas DNA Taq Polimerase yang diinisiasi oleh primer, sehingga *fluorescent reporter* dan *quencher dye* akan terpisah. Akibatnya sinar yang dipancarkan oleh *fluorescent reporter* tidak lagi diredam oleh *quencher dye* sehingga sinarnya dapat ditangkap oleh detektor pada mesin PCR (Siew Leng, *et al.*, 2013).

Peningkatan sinyal fluoresensi yang tertangkap detektor berbanding lurus dengan jumlah produk PCR yang dihasilkan. Dengan mencatat jumlah emisi fluoresen pada setiap siklus, reaksi selama fase eksponensial dapat dipantau. Peningkatan produk PCR yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target.

Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi. Tingkat ekspresi gen diketahui melalui munculnya sinyal amplikon pada grafik di monitor (Siew Leng, *et al.*, 2013).

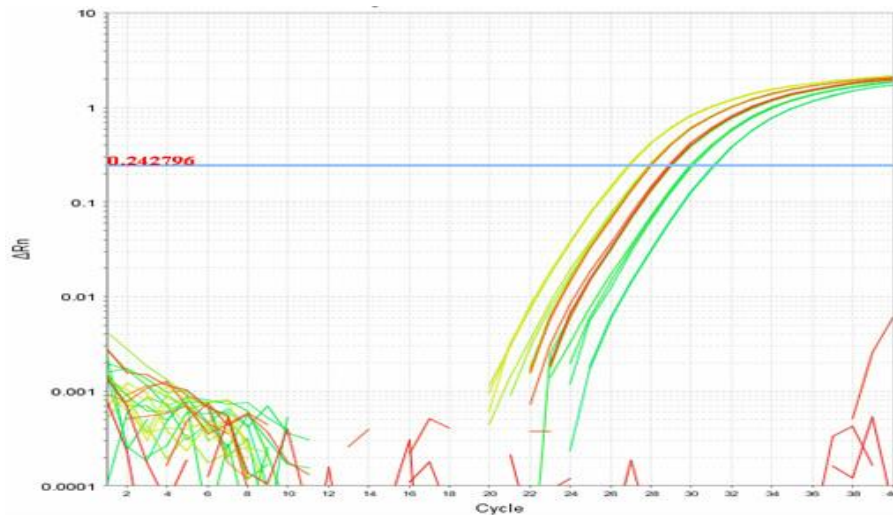


Gambar 3. Prinsip kerja *Taqman Probe* (Yuan, *et al.*, 2000)

Terdapat dua strategi yang dapat digunakan untuk melihat kuantitas RNA dengan *Lighcycler* instrumen yaitu satu tahap atau dua tahap. Masing-masing strategi tersebut memiliki kelebihan masing-masing tergantung pada langkah kerja penelitian.

Keuntungan satu tahap reaksi RT-PCR adalah RNA langsung diproses dalam mesin RT-PCR sehingga proses ini lebih mudah dan kemungkinan hilangnya sampel dan kontaminasi lebih sedikit. Sedangkan pada dua tahap reaksi RT-PCR RNA diubah menjadi cDNA terlebih dahulu menggunakan *Transcriptor reverse Transcriptase*. Kondisi RNA yang tidak stabil dan lebih cepat terdenaturasi. Hal ini diatasi

dengan pengubahan RNA menjadi cDNA dilakukan supaya kondisi RNA lebih stabil dan dapat disimpan pada suhu -20°C sehingga langkah yang dilakukan lebih lengkap.



Gambar 4. Analisis hasil amplifikasi dengan menggunakan Real Time PCR

Dalam *Real Time PCR* reaksi positif diakumulasi dari sinyal *fluorescence* berupa kurva amplifikasi. Nilai Ct yang dihasilkan merupakan jumlah amplicon yang dihasilkan selama proses RT-PCR dengan 40 siklus. Jumlah cDNA yang terbentuk menentukan banyaknya amplicon yang dihasilkan dalam reaksi PCR. Nilai Ct menggambarkan jumlah amplicon (semakin kecil nilai Ct maka semakin banyak jumlah amplicon) sebaliknya semakin besar nilai Ct maka semakin sedikit jumlah amplicon) (Schmittgen and Livak, 2008).

B. Kerangka Berfikir

Sel punca adalah sel yang belum mengalami diferensiasi menjadi bentuk sel yang sempurna. Kemampuan sel untuk berdiferensiasi merupakan potensi sel punca untuk dapat berkembang menjadi sel-sel jenis lainnya, misalnya sel darah, sel kulit, sel saraf, dan sel otot. Regenerasi pada sel punca merupakan suatu kemampuan untuk membelah dan menghasilkan lebih banyak sel-sel punca. Sel-sel ini kemudian akan terus membelah, menjadi sel-sel yang lebih spesifik, sampai akhirnya menjadi sel yang hanya dapat berkembang menjadi satu jenis sel tertentu saja.

Sel punca bertanggung jawab dalam pertumbuhan, homeostasis dan perbaikan berbagai jaringan. Pada jaringan dewasa normal, sel punca dikontrol dengan integrasi faktor intrinsik (misalnya faktor inti sel) dan faktor sik (melalui *growth factor*, stroma dan pengaruh lainnya).

Menurut asalnya sel punca dibedakan menjadi 3 bagian besar yaitu sel punca embrional yang diperoleh dari blastokista, sel punca ekstraembrional yang diperoleh dari tali pusat, plasenta dan cairan amnion serta sel punca dewasa yang diperoleh dari jaringan dewasa sesuai dengan jenis jaringan tempat diperolehnya sel, misalnya sumsum tulang, darah, lemak maupun kulit. Sel punca yang terpapar dengan kondisi tertentu yang sesuai akan berdiferensiasi menjadi 3 lapisan germinal dan juga primordial sel germinal.

Pada penelitian ini sel punca yang digunakan adalah sel punca yang berasal dari sel mesenkim tali pusat. Sel induk adalah sel mesenkim yang belum berdiferensiasi, sering disebut juga sebagai 'sel progenitor' atau 'sel prekursor'. Sel induk bersifat pluripotent, yaitu memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi bermacam-macam jenis sel sesuai dengan kebutuhan lingkungannya. Sel ini merupakan sel yang pertama kali membelah ketika terjadi cedera.

Saat ini sel punca mesenkim banyak digunakan untuk terapi atau pengobatan karena sel ini mampu berdiferensiasi menggantikan sel pada jaringan rusak karena sifatnya yang memiliki kemampuan untuk berkembang. Mekanisme perbaikan dan homeostasis oksigen sel punca ini akan diketahui melalui ekspresi salah satu jenis protein respirasi, yaitu mioglobin.

Sampai sejauh ini belum diketahui apakah sel punca mengekspresikan mioglobin, yaitu protein penting penyimpan dan pembawa oksigen sel untuk pembentukan energi di dalam mitokondria. Oleh karena itu, penelitian deskriptif ini dilakukan untuk melihat gambaran homeostasis oksigen sel punca normoksik atau normal. Deteksi dan analisis ekspresi mioglobin sel punca mesenkim ini dilakukan dengan menggunakan metode *Taqman Probes*.

Metode *Taqman probe* merupakan metode amplifikasi fragmen gen yang menggunakan *probe* spesifik yang akan mengenali gen target pada sel yang diinginkan. Metode *probe* ini memiliki *fluorescent reporter* yang

berada pada ujung 5' dan *quencher dye* yang berada pada ujung 3'. Selama *probe* belum berikatan dengan DNA target atau *probe* tidak dapat berikatan dengan DNA target, maka sinar yang dipancarkan oleh *fluorescent reporter* diredam oleh *quencher dye*. Jika *probe* telah menempel/berhibridisasi dengan DNA target, maka *probe* akan dipotong atau diuraikan oleh aktivitas DNA Taq Polimerase yang diinisiasi oleh primer, sehingga *fluorescent reporter* dan *quencher dye* akan terpisah. Akibatnya sinar yang dipancarkan oleh *fluorescent reporter* tidak lagi diredam oleh *quencher dye* sehingga sinarnya dapat ditangkap oleh detektor pada mesin PCR.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tujuan Operasional

Tujuan operasional pada penelitian ini adalah:

1. Menganalisis ekspresi gen target mioglobin pada hasil *two step* RT PCR.
2. Menganalisis ekspresi gen HIF pada hasil *two step* RT PCR.
3. Menganalisis ekspresi gen betha actin pada hasil *two step* RT PCR.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga Mei 2015 di Laboratorium Biokimia Universitas Negeri Jakarta dan Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia.

C. Sampel

Sampel sel punca mesenkimal yang berasal dari tali pusat pada penelitian ini sejumlah 738.000 sel per mL diperoleh atas jasa baik Prof. Jeanne Pawitan dari UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca, Rumah sakit Cipto Mangunkusumo. Sel punca mesenkimal disimpan dalam preservasi *cyrogenik deep freezer* -80°C dan hasil *pasase* langsung. Sampel sel punca mesenkimal ini merupakan sisa preservasi sel punca pada laboratorium UPT.

D. Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode deskriptif. Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi RNA dari sel punca mesenkimal. Molekul mRNA yang diisolasi akan digunakan untuk mendeteksi gen protein mioglobin dan HIF (*Hypoxia Induce Factor*) dengan menggunakan kontrol betha actin.

E. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri dari sentrifus mikro, pipet mikro eppendorf 0.1-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L, mikro tip, vortex, tabung mikro 1.5 mL, tabung mikro 0.5 mL, gelas kimia, gelas ukur, mesin *Real TimePCRstep One Applied Biosystem*, Personal Thermal Cyler Bio Rad, Micro vacuum Tomy MV-100, Thermo centrifuges DAAD, Laminar Air Flow DAAD, Nanodrop spektrofotometer, sentrifuges Hitachi RXII series, microAmp Optical 8-cap strip applied biosystems, microAmp fast optical 48-well Reaction Plate (0,1) applied biosystems. Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri darisel punca mesenkim, akuabides steril, isopropanol, etanol 75%, klorofom, *TRI reagent Solution*, *High Capacity cDNA Reverse Transcription*, *Taqman Fast Advance Master Mix Product Insert*, dan *Taqman Gene Expression Assay*.

2. Cara Kerja

a. Isolasi mRNA dari sel punca mesenkimal

- 1) Homogenisasi sampel jaringan dalam 10-20 volume TRI Reagent. Homogenisasi sel kultur dalam 1 ml TRI Reagent per $5-10 \times 10^6$ sel atau per 10 cm^2 area kultur dish.
- 2) Menginkubasi homogenat selama 5 menit pada temperatur ruang.
- 3) Sentrifuse homogenat pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C .
- 4) Transfer supernatan ke tube bersih.
- 5) Menambahkan 100 μL BCP atau klorofom per 1 ml TRI Reagent yang digunakan untuk homogenisasi, kocok selama 15 detik.
- 6) Menginkubasi larutan pada temperatur ruang selama 5-15 menit.
- 7) Sentrifuse larutan pada 12.000 rpm selama 10-15 menit pada suhu 4°C .
- 8) Mentransfer aqueous phase ke tube bersih.
- 9) Menambahkan 500 μL isopropanol per 1 mL TRI Reagent Solution.
- 10) Vortex selama 5-10 menit.
- 11) Menginkubasi pada temperatur ruang selama 5-10 menit.
- 12) Sentrifuse pada 12.000 rpm selama 8 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang.

- 13) Menambahkan 1 mL etanol 75 % per 1 mL TRI reagent Solution.
- 14) Sentrifuse pada 7500 rpm selama 5 menit, etanol dibuang dan keringkan pellet.
- 15) Menambahkan buffer pada pellet mRNA sebanyak 300-500 μ L buffer.

b. Amplifikasi molekul mRNA menjadi cDNA menggunakan *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*

Pengubahan mRNA menjadi cDNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan total volume 20 μ L. PCR mix terdiri dari 10x RT *Buffer*, 25x dNTP Mix, 10x RT *random Primers*, *Multiscribe Reverse Transcriptase*, *RNAse Inhibitor*, *Nuclease free water*, mRNA *template*.

Tabel 1. Komposisi formulasi campuran bahan untuk proses PCR Amplifikasi molekul mRNA menjadi cDNA

Komponen	Volume (μL)/Reaksi
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP mix	0,8
10x <i>random Primers</i>	2,0
<i>MultiScribe Revertse Transcriptase</i>	1,0
<i>Nuclease free water</i>	4,2
RNA <i>Template</i>	10,0
Total Volume	20,0

c. Analisis Molekul mRNA menggunakan spektrofotometri

Spektrofotometri yang digunakan adalah *Nano Drop Spectrophotometer*. Sebanyak 2 μL mRNA diteteskan ke alat deteksi pada *Nano Drop Spectrophotometer*. Kemurnian dan konsentrasi mRNA dapat dilihat pada layar monitor mesin *Nano Drop Spectrophotometer*.

d. Deteksi mioglobin dengan *Taqman Probes*

Proses deteksi produk cDNA hasil amplifikasi dilakukan dengan teknik *Fluorescent Hybridization Taqman Probes* menggunakan *two step Real Time PCR*. Total volume reaksi adalah 20 μL yang terdiri dari *Taqman Fast Advance Master Mix*, *Taqman gene Expression Assay*, *nuclease free water*, dan *cDNA template*.

Probe yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Probe TaqMan*. *Probe* tersebut memiliki *fluorescent reporter* (pemancar sinar fluoresen) pada salah satu ujungnya dan *quencher dye* (pemadam sinar) pada ujung yang lain. Tingkat ekspresi gen diketahui melalui munculnya sinyal ampikon pada grafik di monitor.

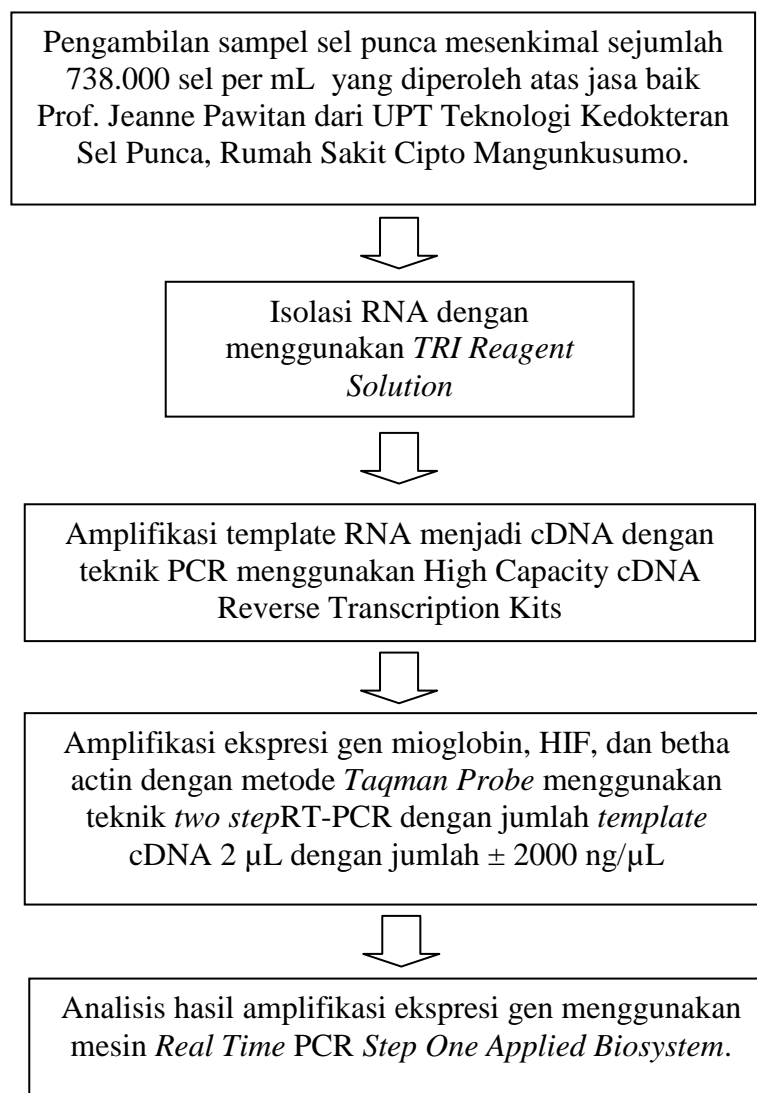
Tabel 2. Komposisi formulasi campuran bahan *two step Real Time PCR* untuk mengamplifikasi gen Mioglobin, HIF 1 α , dan Beta Actin

Komponen	Volume (μL)/Reaksi
<i>Taqman fast Advance master Mix (2x)</i>	10,0
<i>Taqman Gene Expression Assay (20x)</i>	1,0
<i>cDNA Template</i>	2,0
<i>Nuclease free water</i>	7,0
Total volume	20,0

F. Teknik Pengumpulan data

Data yang dikumpulkan adalah berupa grafik yang muncul pada monitor yang menunjukkan bahwa terdapat gen target mioglobin pada sel punca mesenkimal dengan kontrol HIF 1 α yang menyatakan bahwa sel tersebut hipoksia, dan kontrol lain yang digunakan yaitu gen betha actin sebagai kontrol teknik laboratorium.

G. Alur Penelitian



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

1. Hasil Desain *Probe*

Desain *probe* pada penelitian ini menggunakan *Applied Biosystem Taqman Gene Expression Assay Target Protein*. Berikut merupakan hasil desain *probe* yang dilengkapi dengan keterangan lokasi pada kromosom dan ID gen yaitu:

a. MYOGLOBIN

Gene Symbol	: MB
Entrez Gene ID	: 4151
Gene Name	: myoglobin
Gene Aliases	: PVALB, RP4-569D19.7
NCBI Location Chromosome	: Chr.22: 36002811 - 36019401

b. HIF

Gene Symbol	: HIF1A
Entrez Gene ID	: 64344
Gene Name	: hypoxia inducible factor alpha subunit
Gene Aliases	: HIF-1A, IPAS, MOP7, PASD7, bHLHe17
NCBI Location Chromosome	: Chr.19: 46800303 - 46846690

c. B-ACTIN

Gene Symbol	: ACTB
Entrez Gene ID	: 60
Gene Name	: actin, betha
Gene Aliases	: BRWS1, PS1TP5BP1
NCBI Location Chromosome	: Chr.7: 5566779 - 5570232

2. Hasil Isolasi molekul mRNA dari Sel Punca Mesenkimal

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel punca mesenkimal tali pusat sejumlah 738.000 sel per mL yang didapatkan dari UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca, Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo yaitu:

Tabel 3. Sumber perolehan sampel sel punca mesenkimal tali pusat dari lab UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca

Sampel	Penanganan preservasi lab	Jumlah sel per mL
Kelompok A		
Pasien 1 (A1)	<i>Cryogenik deep freezer – 80°C</i>	738.000
Pasien 2 (A2)	<i>Cryogenik deep freezer – 80°C</i>	738.000
Kelompok B		
Pasien 3 (B1)	<i>Pasase langsung</i>	738.000
Pasien 4 (B2)	<i>Pasase langsung</i>	738.000

Isolasi mRNA dilakukan berdasarkan protokol *TRI Reagent Solution*. Molekul mRNA yang diperoleh dari hasil isolasi. Selanjutnya diubah

menjadi cDNA dengan menggunakan *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.

Tabel 4. Data nilai kemurnian dan konsentrasi sampel mRNA

Nomor sampel	A260	A280	Kemurnian (A260/A280)	Konsentrasi (ng/ μ L)
A1	0,406	0,246	1,650	16,23
A2	0,347	0,223	1,556	13,89
B1	16,548	6,211	2.664	661,93
B2	26,743	9,646	2,773	1069,73

Hasil kemurnian mRNA pada tabel (Tabel 4) diatas menunjukkan bahwa mRNA yang telah diisolasi tidak murni. Rasio A260/A280 yang rendah menunjukkan kontaminasi protein. Hasil pada sampel A1 dan A2 memiliki rasio yang kecil yaitu 1,5 – 1,6 hasil ini menandakan bahwa mRNA hasil *cryogenik deep freezer* mengalami degradasi. Sampel B1 dan B2 memiliki rasio yang lebih besar dari 2,0 hal ini diperkirakan adanya kontaminasi dari bahan-bahan lain.

3. Hasil Amplifikasi Molekul mRNA menjadi cDNA

Molekul mRNA hasil isolasi diubah menjadi cDNA dengan menggunakan teknik PCR. Hasil diperoleh dengan melakukan optimasi PCR (Tabel 5).

Tabel 5. Program PCR: untuk mengubah molekul mRNA menjadi cDNA

Tahap	Suhu	Waktu
Tahap 1	25 ° C	10 menit
Tahap 2	37 ° C	120 menit
Tahap 3	85 ° C	5 menit
Tahap 4	4° C	∞

4. Hasil Uji teknik *two step* RT-PCR untuk analisis ekspresi gen Mioglobin, HIF, dan Betha Actin pada sel punca mesenkimal

a. Amplifikasi sampel A1, A2, B1, dan B2 cDNA sel punca mesenkimal

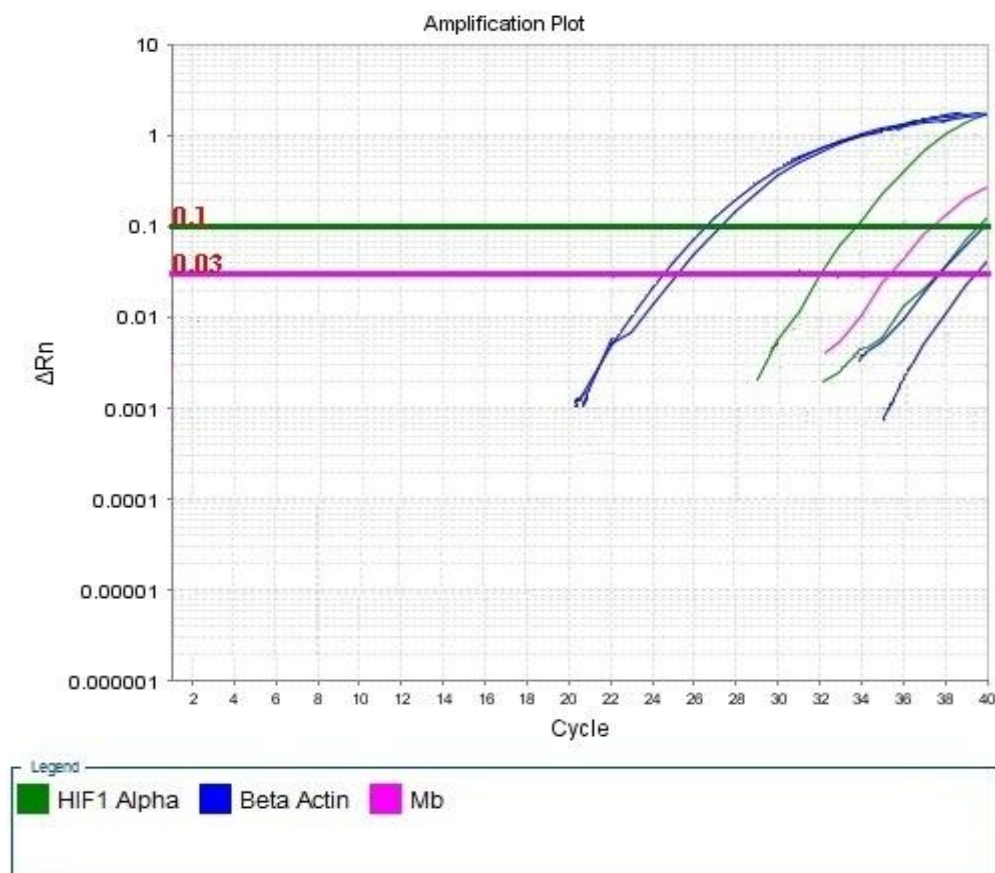
Deteksi hasil amplifikasi untuk semua ekspresi gen target (Mioglobin, HIF, Betha actin) dilakukan dengan teknik *two step* RT-PCR. Semua sampel diaplikasikan menggunakan program *two step* RT-PCR optimum (Tabel 6), yaitu:

Tabel 6. Program *two step* RT-PCR untuk hasil analisis optimum

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Inkubasi	50 ⁰ C	2 menit	1 siklus
Aktifasi Polymerase	95 ⁰ C	20 detik	1 siklus
Denaturasi	95 ⁰ C	3 detik	40 siklus
Anneling / Elongasi	60 ⁰ C	30 detik	40 siklus

Pada penelitian ini digunakan *two step* Real Time PCR yaitu tahap pertama pengubahan mRNA menjadi cDNA. Selanjutnya tahap kedua

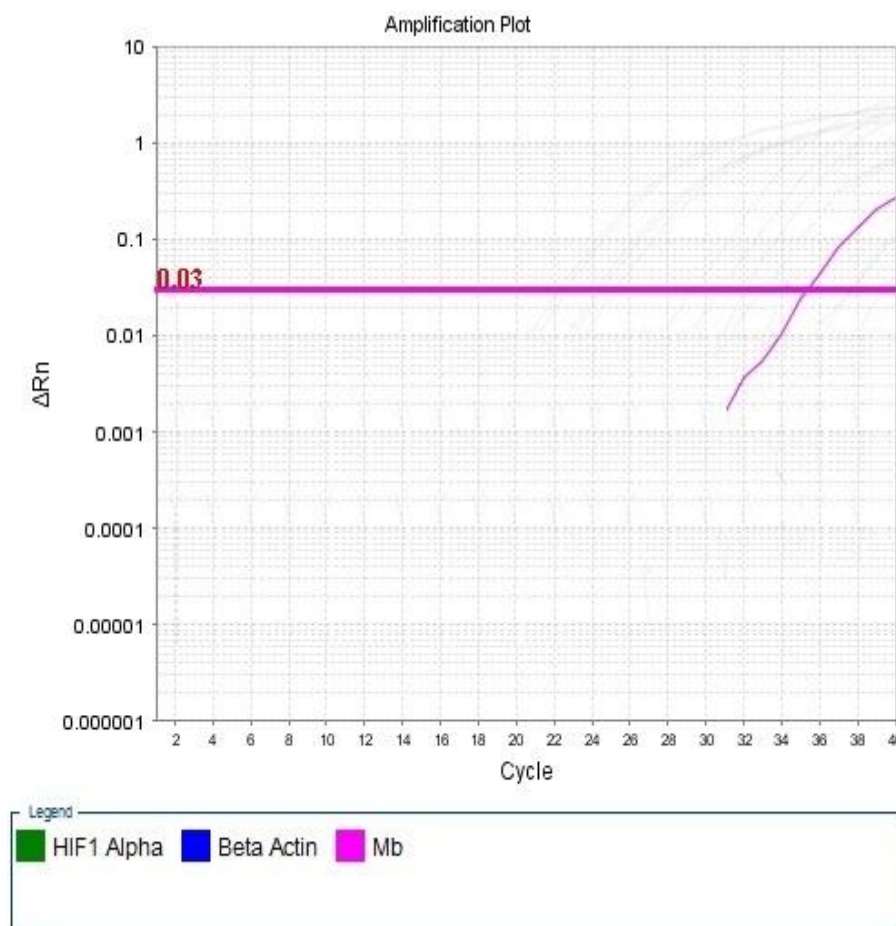
yaitu aplikasi cDNA menggunakan mesin *Real Time PCR*. *Two step Real Time PCR* digunakan untuk memperkecil adanya kontaminasi dan degradasi pada mRNA yang didapatkan dari hasil isolasi.



Gambar 5. Hasil amplifikasi ekspresi gen Mioglobin, HIF dan Beta Actin pada kelompok sampel sel punca mesenkimal yaitu A1, A2, B1, dan B2 dengan komposisi cDNA sebanyak 2 μ L berdasarkan protokol *Taqman Fast Advance Master Mix Product Insert* (Lampiran 1) dengan menggunakan teknik dan program *two step RT-PCR*.

Penelitian ini menggunakan teknik dan program *two step RT-PCR* dan diperoleh hasil bahwa gen mioglobin, HIF dan Beta Actin terekspresi dalam sampel A1, A2, B1, dan B2 sel punca mesenkimal. Hasil amplikon yang dapat dianalisis adalah amplikon yang melewati garis Threshold cycle

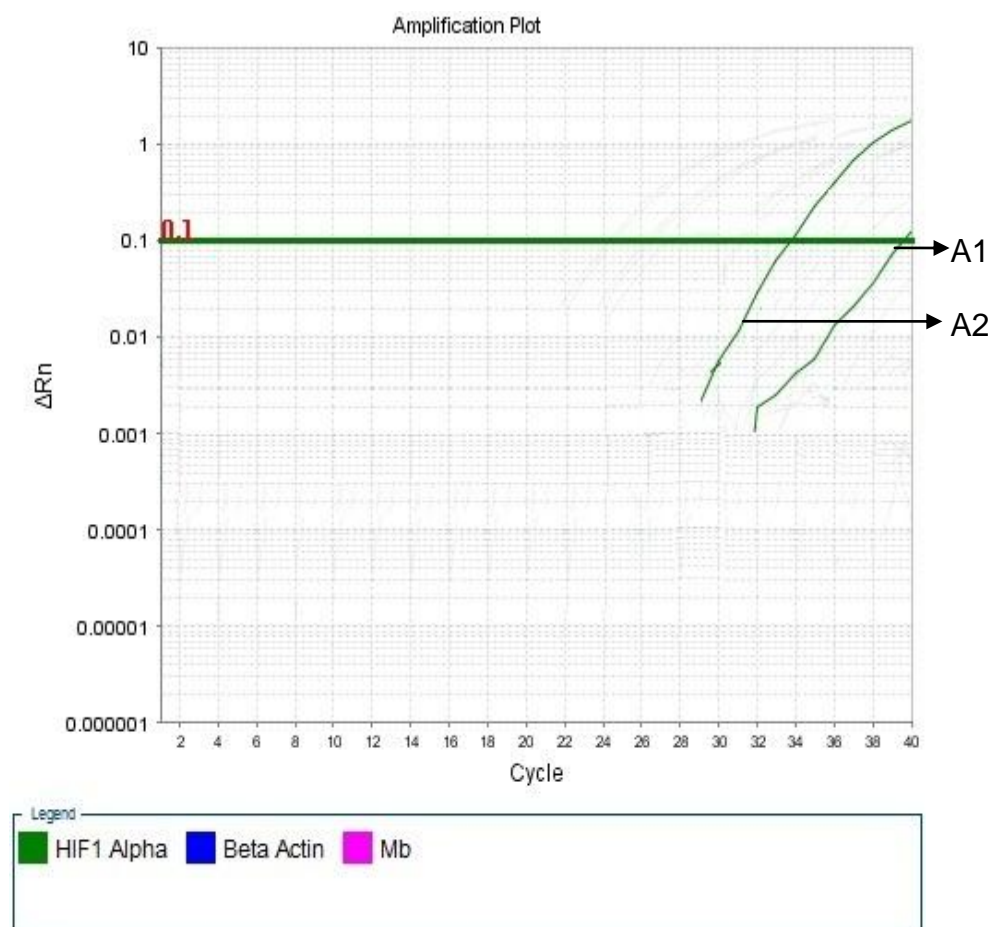
(Ct). Threshold cycle yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,1 dan 0,03.



Gambar 6. Hasil amplifikasi ekspresi gen Mioglobin sel punca mesenkimal yang terdeteksi pada sampel A1 hasil preservasi *cryogenik deep freezer* – 80 °C dengan menggunakan teknik dan program *two step* RT-PCR.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen mioglobin hanya terdeteksi pada sampel A1 sel punca mesenkimal dengan Ct 0.03. sampel A1 dan sampel A2 yang merupakan pengulangan dari sampel A1 sel punca mesenkimal dalam penelitian ini berasal dari penyimpanan

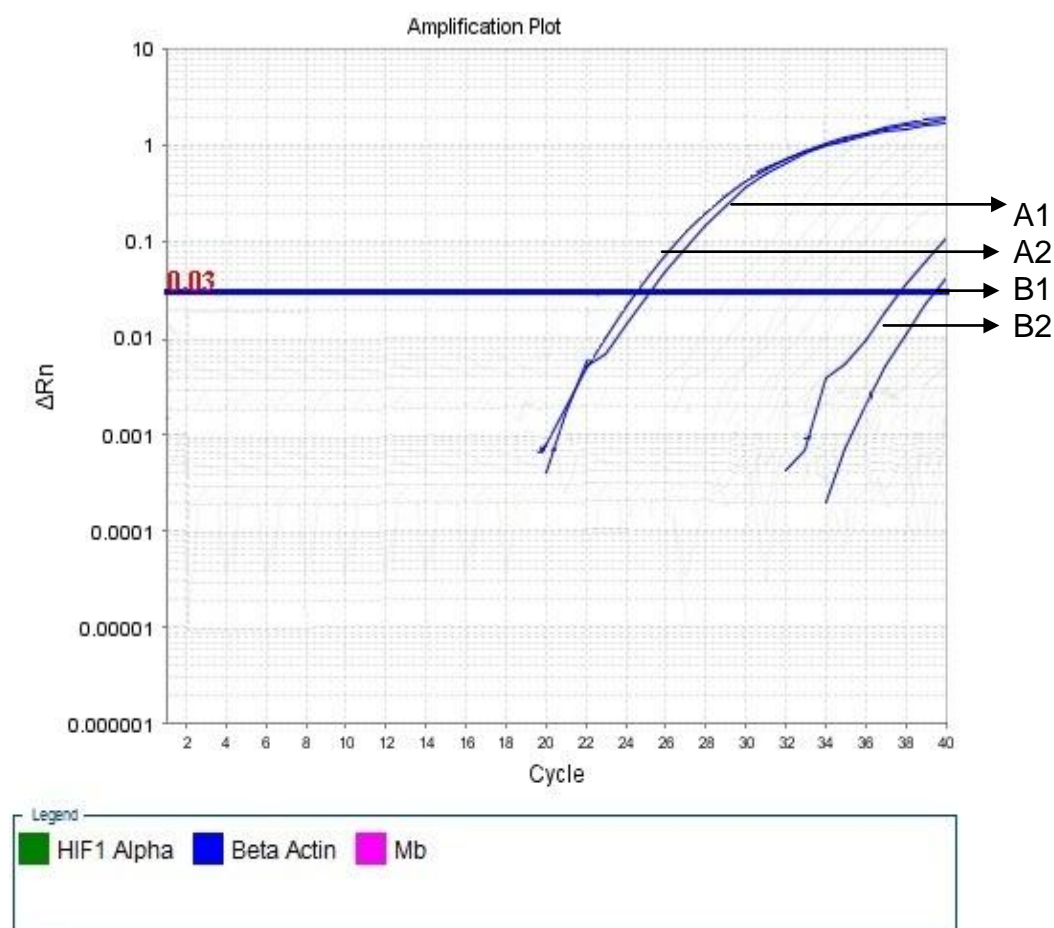
cryogenik deep freezer - 80°C. Sampel A2 tidak menunjukkan ekspresi gen mioglobin. Hal ini mungkin dapat dijelaskan bahwa jumlah cDNA tidak representatif (Tabel 5) sehingga amplicon belum dapat ditangkap oleh mesin RT-PCR. Penggunaan 2 µl sampel cDNA sesuai dengan protokol *Taqman Fast Advance Master Mix Product Insert* (Lampiran 1).



Gambar 7. Hasil amplifikasi ekspresi gen HIF 1 α sel punca mesenkimal pada sampel A1 dan A2 hasil preservasi *cryogenik deep freezer* -80°C dengan menggunakan teknik dan program *two step* RT-PCR.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi gen HIF 1 α tereksresi pada sampel A1 dan A2 sel punca mesenkimal (disimpan dalam *cryogenik deep freezer* -80 °C) dengan Ct 0,1. Sampel sel punca

mesenkimal B1 dan B2 (adalah hasil *pasase* langsung), pada hasil uji menggunakan teknik dan program two step RT – PCR tidak terdeteksi adanya ekspresi gen HIF 1 α .



Gambar 8. Hasil amplifikasi ekspresi gen betha actin sel punca mesenkimal pada sampel A1, A2, B1, dan B2 dengan menggunakan teknik dan program *two step* RT-PCR.

Hasil penelitian ini menunjukkan ekspresi gen betha actin terdeteksi pada sampel A1, A2, B1, dan B2 sel punca mesenkimal dengan Ct 0,03. Hasil ini menunjukkan bahwa teknik laboratorium selama penelitian dilakukan sesuai prosedur.

B. PEMBAHASAN

1. Molekul mRNA dan cDNA hasil isolasi sel punca mesenkimal

Sampel sel punca mesenkimal dalam penelitian ini adalah sejumlah 738.000 sel per mL. Berdasarkan protokol isolasi mRNA menggunakan *TRI Reagent Solution*, bahwa pemakaian 1 mL *TRI Reagen Solution* digunakan untuk 7×10^5 sel per mL. Oleh karena itu, untuk mendapatkan molekul mRNA yang optimum, dalam preparasi sampel penelitian ini dilakukan modifikasi protokol dengan cara menggunakan $\frac{1}{2}$ resep bahan pereaksi yang dianjurkan.

Target jenis sampel mRNA dalam sel punca mesenkimal yang digunakan pada penelitian ini adalah mRNA untuk semua gen Mb, HIF dan betha Actin. Umumnya, jumlah molekul mRNA dalam sel hanya ditemukan sebesar 1-5 % dari total mRNA yang ada. Semua jenis mRNA ini memiliki ukuran dan urutan basa nukloetida yang bervariasi. Ukuran panjang mRNA dapat berbeda-beda, mulai dari beberapa ratus basa sampai ribuan basa nukleotida. Molekul mRNA pada sel mamalia memiliki poli-A yang cukup panjang pada ujung 3' nya sehingga dapat mempermudah mRNA untuk diisolasi (Sambrook dan Rusel, 2001).

Kemurnian mRNA hasil isolasi pada semua sampel terlalu kecil yaitu 1.650 dan 1.556 pada sampel A1 dan sampel A2 dan terlalu tinggi yaitu 2.664 pada sampel B1 dan 2.773 pada sampel B2. Rendahnya konsentrasi pada hasil isolasi mRNA diduga karena adanya kontaminasi

protein maupun bahan yang digunakan selama isolasi mRNA dan kemungkinan juga adanya kontaminasi DNA (Portillo,*et al.*, 2006).

Degradasi mRNA oleh Rnase merupakan salah satu masalah utama dalam isolasi mRNA. Enzim Rnase bersifat stabil karena tidak membutuhkan kofaktor untuk aktifitasnya. Aktivitas Rnase yang tinggi dijumpai pada beberapa tipe jaringan dan sel. Enzim tersebut juga dapat berasal dari kontaminasi selama isolasi mRNA (Darmania, 2015). Oleh karena itu pengerjaan persiapan mRNA, selain harus dilakukan dalam waktu yang sangat cepat namun juga harus steril.

Molekul mRNA sampel yang sudah diperoleh segera disiapkan sebagai *template* mRNA untuk diubah menjadi cDNA (sebagai template teknik *two step* RT – PCR). Template mRNA tersebut harus terjaga dalam keadaan sangat dingin dan steril untuk mencegah degradasi. Kemurnian *template* mRNA (bebas dari kontaminasi protein, polisakarida, maupun DNA) dan integritas mRNA (degradasi) merupakan faktor yang sangat mempengaruhi keberhasilan sintesis cDNA *full-length* (Wang dan Young, 2003).

Proses pengubahan mRNA menjadi cDNA dalam penelitian ini adalah menggunakan *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. Data yang diperoleh adalah bahwa nilai kemurnian cDNA adalah sangat baik, yaitu 1,65 – 2,11 dengan konsentrasi cDNA dalam sampel ± 1000 ng/ μ L. *Complementary DNA* (cDNA) ini dapat pula digunakan untuk keperluan deteksi ekspresi gen eukariot dalam sel prokariot (Nicholl, 2002).

Molekul cDNA diperoleh dari penyalinan mRNA yang sudah tidak memiliki daerah intron pada urutan basa nukleotidanya. Daerah intron dapat mencegah ekspresi gen eukariot pada sel prokariot. Sel prokariot tidak memiliki perangkat untuk memotong daerah intron. Oleh karena itu, cDNA banyak digunakan sebagai sumber DNA pada proses pengklonan maupun deteksi ekspresi gen (Nicholl, 2002).

2. Amplifikasi ekspresi gen mioglobin, HIF 1 alfa dan betha actin sel punca mesenkimal dengan teknik *two step* RT-PCR

Hasil uji teknik *two step* RT-PCR menunjukkan bahwa mioglobin terekspresi pada sampel A1 sel punca mesenkimal (Gambar 5 dan 6). Hasil optimum ekspresi gen target mioglobin sampel A1 sel punca mesenkimal terdapat pada formulasi penggunaan cDNA sebanyak 2 μ L dengan konsentrasi ± 2000 ng/ μ L. Ekspresi gen tersebut terdeteksi dalam kapasitas jumlah yang relatif tinggi dengan *threshold cycle* (Ct) sebesar 0,03, nilai ini menunjukkan jumlah amplicon sedikit karena mendekati akhir siklus RT-PCR. *Threshold cycle* (Ct) dapat disesuaikan untuk setiap percobaan sehingga dapat menunjukkan kurva amplifikasi pada seluruh sampel.

Hasil dari reaksi real-time RT - PCR berupa nilai *threshold cycle* (Ct) yang menunjukkan siklus amplifikasi dimana sinyal fluorescent melewati batas ambang (*threshold*) yang ditandai dengan jumlah amplicon yang bertambah. Dalam *Real Time PCR* reaksi positif

diakumulasi dari sinyal *fluorescence* berupa kurva amplifikasi. Nilai Ct yang dihasilkan merupakan jumlah amplicon yang dihasilkan selama proses RT-PCR dengan 40 siklus. Jumlah cDNA yang terbentuk menentukan banyaknya amplicon yang dihasilkan dalam reaksi PCR. Nilai Ct menggambarkan jumlah amplicon (semakin kecil nilai Ct maka semakin banyak jumlah amplicon sebaliknya semakin besar nilai Ct maka semakin sedikit jumlah amplicon) (Schmittgen and Livak, 2008).

Sampel A1 sel punca mesenkimal ini adalah sel punca yang disimpan dalam *cryogenic deep freezer* -80°C . Proses penyimpanan adalah proses lazim yang dilakukan oleh sebuah laboratorium. Tujuan penyimpanan adalah untuk deposit sel yang nantinya akan digunakan untuk berbagai analisis lebih lanjut atau sekedar sebagai sumber sel punca baru pada pasase berikutnya dalam pembiakan sel punca.

Proses penyimpanan atau preservasi *deep freezer* -80°C memberi pengaruh terhadap kondisi sampel A1 sel punca mesenkimal. Diketahui bahwa penyimpanan seperti itu akan menyebabkan penurunan aktivitas sel sebanyak sekitar 50%. Artinya bahwa kondisi tersebut telah mampu mencetuskan ekspresi gen mioglobin pada sampel A1 sel punca mesenkimal (lihat Gambar 5 dan 6).

Ekspresi gen mioglobin sampel A1 sel punca mesenkimal disertai dengan gambaran ekspresi gen HIF 1 alfa pada sampel tersebut (Gambar 5 dan 7). Ekspresi gen HIF 1 alfa juga terdeteksi untuk sampel A2 sel punca mesenkimal (Gambar 5 dan 7) yang merupakan hasil preservasi

deep freezer -80°C . Hal ini membuktikan bahwa kemungkinan besar proses penyimpanan secara lazim di laboratorium ternyata mempengaruhi keadaan kadar oksigen di dalam sampel sel punca mesenkimal. Kondisi kadar oksigen di dalam sampel sel tersebut memicu ekspresi gen HIF 1 alfa sebagai indikasi kondisi hipoksik awal pada sel (sebagai mekanisme proteksi/respon awal sel terhadap kondisi kadar rendah oksigen lingkungan)

Kondisi kurang oksigen (hipoksia) pada sel/jaringan umumnya ditandai dengan jumlah HIF 1 alfa yang tinggi. Kondisi hipoksia tersebut dalam waktu yang lama akhirnya akan mencetuskan sejumlah besar HIF 1 β . Komplek HIF 1 α dan HIF 1 β menyebabkan elemen promotor gen. Promotor gen akan memicu ekspresi sejumlah gen salah satunya adalah mioglobin yang diperlukan untuk memulai proses pemulihan kadar O_2 sel (Reperfusi) (Puspitaningrum, 2010). Kondisi sel punca mesenkimal pada A1 menggambarkan keadaan proses pemulihan kondisi O_2 yang dibuktikan dengan terdeteksinya ekspresi gen mioglobin (Lihat gambar 5 dan 6).

Namun tidak demikian halnya pada sampel A2 sel punca mesenkimal. Tidak terdeteksinya gen mioglobin (Gambar 5 dan 6) pada sampel A2 kemungkinan disebabkan oleh jumlah mRNA tidak representative.

Ekspresi gen mioglobin tidak terdeteksi pada sampel B1 dan B2 sel punca mesenkim (hasil *pasase* langsung) (Gambar6). Artinya bahwa dalam kondisi kultur sel dan *pasase* pada sampel B1 dan B2 sel punca

mesenkimal dalam keadaan normal (normoksia). Hal ini dibuktikan melalui gambar 6, bahwa sejumlah ekspresi gen HIF 1 alfa yang ada dalam sampel tersebut tidak terdeteksi oleh mesin RT – PCR (masih dalam batasan normoksia).

Seluruh prosedur penelitian ini dikontrol oleh terdeteksinya ekspresi *house keeping gene*, yaitu betha actin (Gambar 8). Gambaran kurva yang terlihat pada masing-masing sampel dalam gambar 8 menunjukkan bahwa semua ekspresi gen yang terjadi berlangsung secara alamiah dan *real*.

3. Ekspresi Gen Moglobin Sel Punca Mesenkimal

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi mioglobin ternyata ditemukan pada sel punca mesenkimal (sebagai bakal jaringan non muskuler). Pencetus ekspresi gen mioglobin adalah kondisi sel kurang oksigen. Hal ini menguatkan penemuan awal Fraser, *et al*, 2006.

Hasil penelitian ini juga menguatkan fungsi utama mioglobin di dalam sel adalah sebagai protein pengikat dan penyimpanan oksigen yang akan ditranfer ke dalam mitokondria yang terdistribusi di seluruh tipe jaringan.

Hasil ekspresi gen HIF 1 α menunjukkan bahwa sampel A1 dan sampel A2 sel punca mesenkimal berada dalam kondisi hipoksia dalam *line threshold cycle* 0,1. Sampel ini berada dalam *preservasi deep freezer*-80°C atau disebut *preservasi cryogenik*. *Threshold cycle* (Ct) pada ekspresi gen HIF 1 α lebih rendah dibanding dengan Ct pada ekspresi gen mioglobin yaitu sebesar 0,03 karena amplikon yang dihasilkan mendekati

akhir siklus, hal ini menunjukkan sampel masih pada tahap awal hipoksik. Kondisi hipoksik pada sel punca dapat mempengaruhi kemampuan diferensiasi sel sehingga akan berpengaruh terhadap implantasi sel punca yang digunakan untuk terapi sel (Helianti dan Candra, 2013).

Berdasarkan penelitian Helianti dan Candra pada tahun 2003, menunjukkan bahwa sel punca pada kondisi hipoksia dapat dijadikan kandidat yang lebih baik dibandingkan dengan sel punca pada kondisi normoksia. Sel punca dapat berkembang pada lingkungan *in vitro* dengan konsentrasi oksigen 1 %- 7%. Kultur invitro pada konsentrasi oksigen tinggi (hiperoksia) dapat mengakibatkan stres oksidatif melalui produksi *reactive oxygen species* (ros) yang merupakan radikal bebas yang dapat merusak lemak, protein dan DNA sehingga merubah metabolisme sel (Helianti dan Candra, 2003). ROS yang tinggi dapat mengakibatkan apoptosis, *senescence* dari sel. Pada konsentrasi O₂ yang sedang bahkan rendah dapat terbentuk ROS intraseluler yang dapat meningkatkan efisiensi metabolisme (Rosova, 2008).

Sel punca pada kondisi hipoksia menunjukkan perkembangan sel yang lebih besar dibandingkan dengan sel punca pada kondisi normoksia dan menunjukkan penurunan apoptosis sel pada sel punca (Helianti dan Candra, 2003).

4. Ekspresi gen betha actin dengan teknik *two step* RT-PCR

Ekspresi mioglobin dalam uji ini dikuatkan oleh adanya ekspresi gen betha actin (Gambar 8). Betha actin merupakan *housekeeping gene*

dalam analisis ekspresi gen, dengan dihasilkannya kurva amplifikasi gen betha actin maka menunjukkan bahwa teknik laboratorium yang dilakukan cukup baik.

Suatu gen disebut housekeeping gene karena gen tersebut mengkode protein yang dibutuhkan untuk tujuan fungsional umum dan penting di sebagian besar tipe sel dan tidak bergantung pada histologi sel (Vandesompele, 2002). Housekeeping gene yang ideal adalah gen yang ekspresinya tidak berubah atau tetap stabil pada setiap sel dan pada kondisi percobaan yang berbeda.

BAB V

KESIMPULAN, IMPLIKASI, DAN SARAN

A. KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh berdasarkan hasil penelitian adalah sebagai berikut:

1. Gen mioglobin pada sel punca mesenkimal terekspresi pada sampel sel punca mesenkimal tali pusat hasil dari preservasi *cryogenik deep freezer* – 80°C.
2. Ekspresi gen mioglobin pada sampel sel punca mesenkimal tali pusat hasil preservasi *cryogenik deep freezer* – 80°C. ditandai dengan adanya sejumlah ekspresi gen HIF 1 alfa yang menunjukkan rendahnya kadar oksigen pada sel.
3. Gen mioglobin dan gen HIF 1 alfa tidak terekspresi pada sampel sel punca mesenkimal tali pusat hasil dari *pasase* langsung.
4. Teknik laboratorium yang dilakukan dalam penelitian ini sudah sesuai dengan prosedur, hal ini dibuktikan dengan terdeteksi ekspresi gen Betha Actin pada semua sampel sel punca mesenkimal tali pusat.

B. IMPLIKASI

Implikasi dari penelitian ini adalah gen mioglobin terekspresi pada sel punca hasil preservasi *cryogenik deep freezer* -80°C yang juga

mengekspresikan gen HIF (*Hypoxia Induce Factor*) yang dengan betha actin sebagai kontrol teknik lab.

C. SARAN

Saran dari penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian selanjutnya untuk lebih mengetahui ekspresi gen mioglobin pada sel punca hipoksia dan normoksia.
2. Perlu adanya lebih banyak pengulangan pada sampel sehingga dapat menguatkan hasil penelitian.
3. Kontrol teknik laboratorium yang digunakan diperbanyak sehingga mendapat hasil yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong L., Lako M., Lincoln J., Cairns P. M., and Hole N., mTert. 2000. Expression Correlates with Telomerase Activity During The Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Mechanisms of Development*, 97(1-2), 109-116.
- Arkhipov, Anton, Braun, Rosemary., dan Yin Ying. 2008. *Case Study: Myoglobin*. Available at: www.ks.uiuc.edu/Training/CasaeStudies/Myoglobin.pdf.
- Burdon T., Smith A., and Savatier P. 2002. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells, *Trends in Cell Biol.* 12(9), 432-438.
- Brahimi-Horn C, Mazure N, and Pouyssegur J. 2005. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal.* 17, 1-9.
- Darmania dan Imam. 2015. Total RNA isolation from the mesocarp of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *Tenera*) fruits. *Pros sem nas masy biodiv indon.* 171-176.
- Du, H., Taylor H.S. 2009. Stem cells and female reproduction. *Reprod Sci*, 16 (2),126-139.
- Fraser, J., Vieira de Mello, L., Ward, D., Rees, HR., Williams, DR.,Fang Y., Brass, A., Gracey, AY., Cossins, AR. 2006. Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *PNAS*, 103(8). 2977–2981.
- Friedenstein AJ, Piatetzky S II, Petrakova KV. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.*J. Embryol. Exp. Morphol.* 16. 381-390.
- Giblet, W.B., et. al. 1987. Myoglobin as an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction. *Annals of Emergency Medicine.* 16, 851-856.
- Gültekin, Sinan. 2009.*Role of Environmental Factors in Mesenchymal Stem Cell Biology*. A Thesis Submitted to The Department of Molecular Biology and Genetics and The Institute of Engineering and Science of Bilkent University.

- Helianti dan Candra, Bumi. 2013. *Model terapi sel menggunakan mesenchymal stem cells (MSCS) pada kelinci miokard infrakardial melalui peningkatan kemampuan diferensiasi*. DIKTI.
- Hendarwan, Siufui., et al. 2009. Expression of hypoxia inducible factor-1a (HIF-1a) gene and apoptosis in the heart induced by systemic hypoxia. *Hypoxia and expression of HIF-1a*. 18 (2): 97-101.
- Hendgen-Cotta et al., 2008. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(34):12636.
- Horwitz E. M. 2003. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Archives of Medical Research*. 34, 600-606.
- Hun Yun., et al. 2014. The Impact of Mesenchymal Stem Cell Source on Proliferation, Differentiation, Immunomodulation and Therapeutic Efficacy. *Stem cell Research and Therapy*. 4:10.
- Postnikova, G.B., dan Shekhovtsova, E. A. 2013. Myoglobin and Mitochondria: How Does The "Oxygen Store" Work?. *J Phys Chem Biophys*. 3: 126.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. 2002. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*, *Nature*. 418: 41-49.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., Tilly, J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature Publish*. 428, 145–152.
- Jonathan B. Wittenberg and Beatrice A. Wittenberg. 2003. Myoglobin function reassessed. *The J. of Exp Biol*. 206, 2011-2020..
- Lee, J.W., S.H. Bae, J.W. Jeong, S.H. Kim, K.W. Kim. 2004. *Exp. Mol Med*. 36 (1): 1-12.
- Kaelin W. G., and Ratcliffe P. J. 2008. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Cell*. 30, 393-402.
- Keith B and Simon MC. 2007. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 129, 465–472.
- Kuchipudi., et al. 2012. 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real

- time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology Journal*. 9:230.
- Masagus dan Lutfah. 2013. Role of manganese-containing super oxide dismutase (MNSOD) in regulation of expression hypoxia inducible factor-1A (HIF-1A) on hypoxia. *Media Litbangkes*. 23(4): 143-148.
- Mckeown S.R. 2013. Defining normoxia,physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. *International Journal of Radiology*.
- Meyer, A Ronald. 2004. Aerobic Performance and The Function of Myoglobin In Human Skeletal Muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287: 1304–1305.
- Morrison S. J., Shah N. M., and Anderson D. J. 1997.*Regulatory mechanisms in stem cell biology, Cell*. 88(3): 287-298.
- Nelson, DL dan MM Cox. 2005.*Lehninger Principles of Biochemistry*.4Th edition. W.H. Freeman and Company.
- Nicholl, D.S.T. 2001. *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press. New York: xi + 292 hlm.
- Orbay H, Tobita M, Mizuno H. 2012. Mesenchymal stem cell isolated fromadipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells Int* 2012: 461718.
- Parte, D., Bhartiya, J., Telang, S. 2011. Detection, characterization andspontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stemcells in adult mammalian ovary. *Stem Cells and Development*, 20(8),1451–1464.
- Portillo, Mary *et al*. 2006. Evaluation of different RNA extraction methods for smallquantities of plant tissue: Combined effects of reagent typeand homogenization procedure on RNA quality-integrity and yield. *Physiologia Plantarum*. 128: 1–7.
- Postnikova, G.B., dan Shekhovtsova, E. A. 2013. Myoglobin and Mitochondria: How Does The “Oxygen Store” Work?. *J Phys Chem Biophys* 3: 126.
- Puspitaningrum *et al*. 2010. Myoglobin expression in Chelonia mydas brain, heart and liver tissues, *Hayati Journal Biosciences*.

- Romero-Herrera, A.E. and Lehman, H. 1974. *The Amino Acid Sequence of Human Myoglobin and its Minor Fractions*. Proc R Soc Lond, 186, 249-279.
- Rosova, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., Noltab, JA., 2008, HypoxicPreconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal. *Stem Cells*. 26:2173–2182.
- Saleha, Hannum., et al. 2010. Isolasi fragmen cDNA dari gen penyandi aktin dari *Melastoma malabathricum*. *Makara Sains*. Vol.14 no,2.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.vol 2.
- Schmittgen, T.D., and K.J. Livak. 2008.Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative CT Method. *Nature Protocols*. 3(6): 1101-1108.
- Septelia,Syarifah, dan Reni. 2009. Ekspresi relatif mRNA HIF-1 α pada jantung, otak, dan darah tikus selama induksi hipoksia sistemik. *Makara Sains*. Vol 13 No.2.
- Serakinci N., and Keith W. N. 2006. Therapeutic potential of adult stem cells, *European Journal of Cancer*, 42(9), 1243-1246.
- Siew Leng Kho., et al. 2013. *High Throughput Molecular Confirmation of β -Thalassemia Mutations Using Novel TaqMan Probes*.*Sensors*, 13, 2506-2514.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007.*Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*. 131, 861-72.
- Takahashi. K, Yamanaka S. 2006. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*, *Cell*. 126, 663-76.
- Till J. E., and McCulloch E. A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, 14, 213-222.
- Vandesompele, J,. 2002. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol*. 3, 7, 34.1 – 34.11.


Wang X, Young III WS. 2003. Rapid amplification of cDNA ends. In: Bartlett, JMS, Stirling D. 2003. *Methods in molecular biology*. Vol. 226. PCR Protocols. 2nd ed. Humana Press Inc., Totowa.

William G. Kaelin, Jr., and Peter J. Ratcliffe. 2008. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Cell press*.

Yuan, Chiu-Chin., Raymond J. Peterson, Cheng-Dian Wang, Frederico Goodsaid, and David J. Waters. 2000. 59 Nuclease Assays for the Loci CCR5-1/D32, CCR2-V64I, and SDF1-G801A Related to Pathogenesis of AIDS. *Molecular Diagnostics and genetics*. 46:124–30.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Protokol formulasi campuran bahan *two step Real Time PCR*



TaqMan® Fast Advanced Master Mix Product Insert

For Research Use Only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Insert PN 4444602 Rev. C

Product part numbers and storage conditions

Product	Quantity/part number						Storage conditions
	1 x 1 mL	1 x 5 mL	2 x 5 mL	5 x 5 mL	10 x 5 mL	1 x 50 mL	
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	4444556	4444557	4444963	4444964	4444965	4444558	Store at -15 to -25 °C until first use, then store at 4 °C.

Protocol for TaqMan® and Custom TaqMan® Gene Expression Assays

Note:

This Product Insert briefly describes how to perform gene expression experiments using the TaqMan® Fast Advanced Master Mix with TaqMan® and Custom TaqMan® Gene Expression Assays. For more detailed procedures, or for procedures on performing gene expression experiments with TaqMan® MicroRNA Assays or TaqMan® Array Micro Fluidic Cards, refer to the *TaqMan® Fast Advanced Master Mix Protocol* (PN 4444605).

Prepare the PCR reaction mix

1. Thoroughly mix the TaqMan® Fast Advanced Master Mix.
2. Thaw frozen samples and frozen TaqMan® assays on ice. Resuspend by vortexing, then briefly centrifuge.
3. Calculate the total volume required for each component: *volume for 1 reaction × the total number of reactions.*

Component	Volume (µL) for 1 reaction		Final concentration
	384-well plate	96-well and 48-well plates (both Standard and Fast)	
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	5.0	10.0	1X
TaqMan® Gene Expression Assay (20X) or Custom TaqMan® Gene Expression Assay (20X)	0.5	1.0	1X
cDNA template	1.0	2.0	100 ng to 1 µg
Nuclease-free water	3.5	7.0	
Total volume per reaction	10.0	20.0	

4. Add all components to a 1.5-mL microcentrifuge tube, cap the tube, then vortex briefly to mix.
5. Centrifuge the tube briefly to spin down the contents and eliminate air bubbles.


Prepare and run the PCR reaction plate

1. Transfer the appropriate volume of PCR reaction mix to each well of an optical reaction plate.
2. Cover the reaction plate, then centrifuge the plate briefly to spin down the contents and eliminate air bubbles.
3. Run the PCR reaction plate using the parameters below.
 - Run mode:

Applied Biosystems Real-Time PCR System	Mode
7900HT, 7900HT Fast (384-Well Block Module and Standard 96-Well Block Module), 7500, and 7300 systems	Standard
VIA™ 7, StepOne™, StepOnePlus™, 7900HT Fast (Fast 96-Well Block Module), and 7500 Fast systems	Fast



Product Insert
06/2010

Lampiran 2. Tanda bukti penerimaan sel punca mesenkimal tali pusat dari UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM



UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca RSCM-FKUI

RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, Gedung Central Medical Unit 2 Lt. 5
 Jl. Diponegoro No. 71, Jakarta Pusat, 10430, Indonesia
 Telp: +62 21-44338817, Fax: +62 21-44338828, Mobile: +62 21-44338818, Email: sel.punca@rscm.fkui.hsc.go.id

TANDA TERIMA

Telah diterima dari : UPT Teknologi Kedokteran Sel Punca

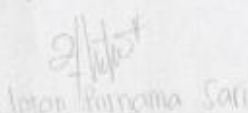
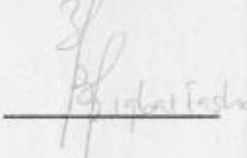
Berupa : Sampel Collection Kit Info Pack
 Kwitansi No. Agreement Sel MSC P2

Sejumlah : Sampel MSC tali pusat

Keterangan : 2021-52-02-DB-F1 P2 : Cell U. Sp: in ...

Diterima oleh, Jakarta, 17 Des20 19

Hormat kami,

Lampiran 3. Prosedur Penelitian

a. Isolasi molekul mRNA

1. Pengambilan sampel sel punca dari UPT Kedokteran Sel Punca Rumah sakit Cipto Mangunkusumo.
2. Sentrifuse sampel selama 10 menit pada 3000 rpm pada suhu 4 °C untuk mengendapkan sel sehingga terpisah dari media pelarutnya.
3. Supernatan dibuang, tambahkan 500 µL (0,5 mL) TRI Reagent Solution (memakai ½ reaksi dari anjuran protokol) (pekerjaan dilakukan di laminar air flow).
4. Inkubasi homogenat selama 5 menit pada suhu ruang.
5. Sentrifuse pada 12.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4 °C.
6. Supernatan ditransfer pada tube baru.
7. Tambahkan klorofom 50 µL lalu inkubasi 15 menit pada suhu ruang.
8. Sentrifuse pada 12.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4 °C.
9. Supernatan ditransfer ke tube baru lalu tambahkan 250 µL isopropanol, vortex selama 10 detik.
10. Inkubasi sela 10 menit pada suhu ruang.
11. Sentrifuse pada 12.000 rpm selama 8 menit dengan suhu 4 °C, lalu supernatan dibuang.
12. Tambahkan ethanol 75 % ke dalam pellet.
13. Sentrifuse pada 7.500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4 °C.

14. Supernatan dibuang, lalu dikeringkan dengan menggunakan Aspirator.

15. Tambahkan *nuclease free water* pada pelet RNA.

b. Mengubah mRNA menjadi cDNA

1. Membuat master mix sesuai protokol *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Table 1) kedalam mikrotube 0,2 mL.

2. Campuran bahan PCR sebanyak 10 μ L.

3. Masukkan 10 μ L RNA hasil isolasi ke dalam campuran bahan PCR.

4. Mix campuran bahan dengan RNA selama beberapa saat.

5. Masukkan tube yang sudah berisi campuran ke dalam mesin PCR.

6. Program PCR sesuai dengan protokol *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (tabel 4).

c. Deteksi mioglobin dengan *Taqman Probes* menggunakan teknik Real Time PCR.

1. Preparasi sampel dan bahan *Real Time* PCR.

2. Deteksi menggunakan *microAmp fast optical 48-well Reaction Plate (0,1) applied biosystems* sehingga menggunakan volume 20 μ L (Lihat Lampiran 1 dan Tabel 2).

3. Mix semua campuran bahan pada mikrotube 0,2 mL.

4. Masukkan 2 μL cDNA ke dalam campuran bahan real Time PCR.
5. Transfer campuran bahan dan cDNA ke dalam *microAmp fast optical 48-well Reaction Plate (0,1) applied biosystems*.
6. Running dengan menggunakan protokol *Taqman Fast Advance Master Mix* (Tabel 6).

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini, mahasiswa Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta,

Nama : Intan Purnama Sari
No. Registrasi : 3425102440
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi

menyatakan bahwa skripsi yang saya buat dengan judul "Identifikasi Ekspresi Gen Mioglobin Pada Sel Punca Mesenkimal " adalah:

1. Ditulis dan diselesaikan oleh saya sendiri berdasarkan data yang diperoleh dari hasil pengamatan dari bulan Maret sampai Mei 2015
2. Bukan merupakan duplikasi skripsi yang pernah dibuat oleh orang lain dan bukan terjemahan karya tulis orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Saya bersedia menanggung segala akibat yang timbul jika pernyataan ini tidak benar.

Jakarta, Juni 2015

Pembuat Pernyataan,



Intan Purnama Sari

NIM. 3425102440

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



INTAN PURNAMA SARI. Dilahirkan di Bekasi, 28 November 1992. Anak kelima dari tujuh bersaudara dari pasangan Abu dan Siti Soleha. Pendidikan formal yang pernah ditempuh adalah SDN Harapan Baru III Kota Bekasi lulus pada tahun 2004, SMPN 3 Kota

Bekasi lulus pada tahun 2007, MAN 1 Kota Bekasi lulus pada tahun 2010. Pada tahun 2010 penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Biologi di FMIPA Universitas Negeri Jakarta melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Penulis pernah mengikuti pelatihan IT mengenai SPSS pada tahun 2013 dan beberapa seminar: seminar nasional Manajemen kesehatan lingkungan dan keselamatan kerja pada tahun 2015 dan seminar nasional *Update On New Technology In Cell Culture And Stem Cells* pada tahun 2015. Penulis juga pernah menjadi trainer pada workshop dan seminar nasional *The Utilization Of Gene Manipulation Techniques In Increasing Human Welfare In Indonesia* pada tahun 2014.

Pada tahun 2013 penulis mengikuti Kuliah Kerja Lapangan di Kebun Raya Eka Bali dan pada tahun yang sama penulis mengikuti Praktek Kerja Lapangan yaitu “Amplifikasi Fragmen DNA dengan Teknik PCR”. Pada tahun 2014 penulis menjadi asisten dosen untuk mata kuliah praktikum Genetika Molekuler.