



## JURNAL MEDICAL LABORATORY

Halaman Jurnal: <https://ejournal.stikeskesosi.ac.id/index.php/Medlab>  
Halaman Utama Jurnal : <https://ejournal.stikeskesosi.ac.id/index.php/Medlab>



# EKSPRESI MnSOD PADA *BREAST CANCER CELL LINE* MENGGUNAKAN TEKNIK qRT-PCR (*QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Gita Wideani<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, STIKes Kesetiakawanan Sosial Indonesia, Jakarta, Indonesia

e-mail : gita.wideani@gmail.com

No Tlp WA : 081280304807

### ABSTRACT

*MnSOD has an important role in regulating cellular O<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations which are strong oxidants and various other by-products of cellular metabolism. Changes in MnSOD concentrations are associated with various neurodegenerative diseases. Overexpression of MnSOD can suppress the tumorigenicity of breast cancer cells, so it is suspected that MnSOD is a tumor suppressor gene in various types of cancer. Through in vitro experiments it is known that MDA-MB-231 cells used as an indicator of cell transformation and tumorigenicity. Real time quantitative PCR (qRT-PCR) is a sensitive, specific and reproducible nucleic acid quantitation method. Since its initial development, qRT-PCR has been revolutionary in the field of molecular diagnostics and the technique is used in various applications requiring short analysis times. This study aims to examine MnSOD expression in the MDA-MB-231 breast cancer cell line using the qRT-PCR technique. The sample in this study was mRNA from the MDA-MB-231 cell line culture. Based on the research results, there was a decrease in MnSOD gene expression in MDA-MB-231 cells by 0.320 compared to CSA-ALDH stem cells.*

**Keywords:** *MnSOD, breast cancer cell line, qRT-PCR.*

### ABSTRAK

MnSOD memiliki peran penting dalam meregulasi konsentrasi O<sub>2</sub><sup>-</sup> seluler yang merupakan oksidan kuat dan berbagai produk samping lain dari metabolisme sel. Perubahan konsentrasi MnSOD dikaitkan dengan berbagai penyakit neurodegeneratif. Overekspresi MnSOD dapat mensupresi tumorigenisitas sel kanker payudara sehingga diduga MnSOD adalah gen suppresor tumor pada berbagai jenis kanker. Melalui percobaan secara in vitro diketahui bahwa sel MDA-MB-231 digunakan sebagai indikator transformasi sel dan tumorigenisitas. *Real time quantitative PCR* (qRT-PCR) merupakan metode kuantitasi asam nukleat yang sensitif, spesifik dan reproduisible. Sejak awal pengembangannya, qRT-PCR menjadi revolusioner di bidang diagnostik molekuler dan tekniknya digunakan dalam berbagai aplikasi yang membutuhkan waktu analisa singkat. Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi MnSOD pada sel line *breast cancer* MDA-MB-231 dengan menggunakan teknik qRT-PCR. Sampel pada penelitian ini adalah mRNA dari kultur sel line MDA-MB-231. Berdasarkan hasil penelitian terjadi penurunan ekspresi gen MnSOD pada sel MDA-MB-231 sebesar 0,320 dibandingkan dengan sel punca CSA-ALDH.

**Kata kunci :** MnSOD, kanker payudara sel line, qRT-PCR.

## 1. PENDAHULUAN

Mangan superoksida dismutase (MnSOD) adalah enzim antioksidan yang melindungi sel dari kerusakan akibat stres oksidatif dengan cara mengkatalisis perubahan superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen dalam mitokondria sel eukariot. Disamping itu MnSOD memiliki peran penting dalam meregulasi konsentrasi  $O_2^{\cdot-}$  seluler yang merupakan oksidan kuat dan berbagai produk samping lain dari metabolisme sel.

Perubahan konsentrasi MnSOD dikaitkan dengan berbagai penyakit neurodegeneratif. Beberapa jenis tumor diketahui memiliki aktivitas MnSOD rendah. Overekspresi MnSOD dapat mensupresi tumorigenitas sel melanoma manusia, sel kanker payudara dan sel glioma sehingga diduga MnSOD adalah gen supresor tumor pada berbagai jenis kanker.

Terdapat tiga isoform enzim SOD di sel mamalia yaitu Sod1, Sod2 dan Sod3. Gen Sod1 mengkode SOD yang mengikat ion Cu dan Zn pada situs katalitik enzim sehingga penamaannya adalah CuZnSOD. CuZnSOD dapat ditemukan di dalam nukleus, sitoplasma dan ruang intermembran mitokondria. SOD ekstraseluler (ECSOD) juga mengandung tembaga dan zink, dikode oleh gen Sod3. Sesuai dengan penamaannya ECSOD berada di membran plasma dan dilepaskan ke dalam matriks ekstraseluler. Berbeda dengan kedua isoformnya, gen Sod2 mengkode MnSOD yang membutuhkan mangan pada situs katalitik enzimnya. Enzim ini hanya dapat ditemukan di matrix mitokondria.

Penelitian terkait bagaimana dan mengapa terjadi perubahan aktivitas MnSOD pada sel tumor ganas telah dimulai lebih dari 30 tahun lalu. Oberley dan Buettner mengungkapkan bahwa MnSOD adalah penentu keganasan tumor, dan penurunan ekspresi MnSOD akan mengarahkan perubahan sel normal menjadi sel malignan. Hipotesis yang dicetuskan oleh Oberley dan kolega menyatakan bahwa terjadi gangguan keseimbangan antara  $O_2^{\cdot-}$  sebagai sinyal proliferasi dan  $H_2O_2$  sebagai sinyal diferensiasi pada sel kanker. Peningkatan influks  $O_2^{\cdot-}$  dikarenakan kurangnya jumlah MnSOD dalam sel sehingga berkontribusi pada pertumbuhan

tak terbatas dan hilangnya kemampuan diferensiasi sel kanker. Hipotesis kedua adalah untuk mengubah aktivitas metabolik, sel kanker berada di lingkungan yang lebih banyak senyawa pengoksidasi dibandingkan sel normal. Berbagai protein yang terlibat dalam jalur transduksi dan faktor transkripsi bersifat sensitif terhadap reaksi reduksi-oksidasi. Sehingga lingkungan pengoksidasi yang dengan muncul akibat hilangnya MnSOD akan mendukung transformasi sel kanker.

### **Kanker Payudara**

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang mempunyai prevalensi cukup tinggi. Kanker payudara dapat terjadi pada pria maupun wanita, hanya saja prevalensi pada wanita jauh lebih tinggi. Upaya untuk menurunkan angka kematian akibat kanker payudara melalui deteksi dini dengan skrining, peningkatan terapi ajuvan, penurunan penggunaan terapi pengganti hormon memberikan harapan baru bagi penderita kanker.

Kanker payudara dapat dibagi menjadi beberapa subtipe yang berimplikasi pada prognostik dan terapetiknya. Pasien kanker payudara secara rutin dievaluasi ekspresi reseptor esterogen (ER), reseptor progesteron (PR) dan amplifikasi Human ephitelial receptor (HER-2)/Neu. Penanda ini menjadikan klasifikasi kanker payudara sebagai tumor positif reseptor hormon, tumor HER2/Neu teramplifikasi dan tumor yang tidak mengekspresikan ER, PR dan amplifikasi HER-2/Neu. Kelompok terakhir ini dikenal sebagai *triple-negative breast cancer* (TNBC).

Pada umumnya tumor pada payudara bermula dari sel epitelial, sehingga kebanyakan kanker payudara dikelompokkan sebagai karsinoma (keganasan tumor epitelial). Sedangkan sarkoma, yaitu keganasan yang berawal dari jaringan penghubung, jarang dijumpai pada payudara. Berdasarkan asal dan karakter histologinya kanker payudara dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu in situ karsinoma dan invasive karsinoma. Karsinoma in situ dikarakterisasi oleh lokalisasi sel tumor baik di duktus maupun di lobular, tanpa adanya invasi melalui membran basal menuju stroma di sekelilingnya. Sebaliknya pada invasive karsinoma, membran basal akan rusak sebagian atau secara keseluruhan dan sel

kanker akan mampu menginvasi jaringan di sekitarnya menjadi sel metastatik. Sel kanker payudara dapat tumbuh menjadi benjolan sebesar 1 cm<sup>2</sup> dalam waktu 8-12 tahun.

Penyebab kanker payudara sangat beragam, tetapi ada sejumlah faktor risiko yang dihubungkan dengan perkembangan penyakit ini yaitu asap rokok, konsumsi alkohol, umur pada saat menstruasi pertama, umur saat melahirkan pertama, lemak pada makanan, dan keturunan. Hormon juga memegang peranan penting dalam terjadinya kanker payudara. Estradiol dan atau progesteron dalam daur normal menstruasi meningkatkan resiko kanker payudara. Hal ini terjadi pada kanker payudara yang memiliki reseptor estrogen, dimana 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang tergantung estrogen.

Selain itu, kompleks estrogen dengan reseptornya juga akan memacu transkripsi beberapa gen tumor suppressor, seperti BRCA1, BRCA2, dan p53. Akan tetapi pada penderita kanker payudara (yang umumnya telah lewat masa menopause) gen-gen tersebut telah mengalami perubahan akibat dari hiperproliferasi sel-sel payudara selama perkembangannya sehingga tidak berperan sebagaimana mestinya. Resiko terjadinya kanker payudara karena mutasi pada gen ini sebesar 80-90 % pada wanita. Gen p53 secara normal menyandi protein yang terlibat dalam kontrol pertumbuhan sel dan terjadinya mutasi pada gen ini dapat menyebabkan pertumbuhan sel menjadi tidak terkontrol.

### ***Cell line* MDA-MB-231**

*Cell line* kanker telah terbukti manfaatnya dalam percobaan dan investigasi preklinik sejak pertama kali dikembangkan, yaitu sekitar 50 tahun yang lalu. Sel kanker dengan karakteristik triple negatif tertua, BT20, dikembangkan dari efusi pleural pada 1950.

*Cell line* kanker payudara MDA-MB-231 diperoleh dari pasien pada tahun 1973 di M.D. Anderson Cancer Center. Morfologi sel ini menyerupai sel epitel dengan fenotipnya berbentuk *spindle*. Melalui percobaan secara *in vitro* diketahui bahwa sel MDA-MB-231 memiliki fenotip invasif dan dapat tumbuh di media agarose, digunakan sebagai indikator transformasi sel dan tumorigenisitas,

tumbuh serta berada dalam bentuk koloni. MDA-MB-231 merupakan sel kanker triple negatif dan memiliki *doubling time* 38 jam.

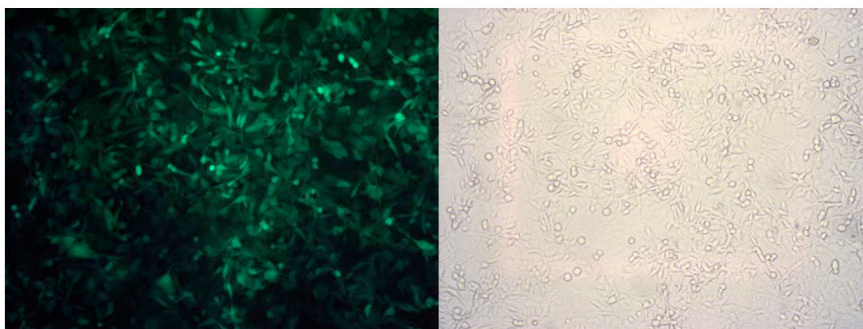


Figure 1. MDA-MB-231/GFP Cell Line. Left: GFP Fluorescence; Right: Phase Contrast.

Gambar 1. *Cell line* MDA-MB-231. Kiri : fluoresensi, kanan : *Phase contrast*

### qRT-PCR

*Real time quantitative* PCR (qRT-PCR) merupakan metode kuantitasi asam nukleat yang sensitif, spesifik dan reproduisible. Sejak awal pengembangannya, qRT-PCR menjadi revolusioner di bidang diagnostik molekuler dan tekniknya digunakan dalam berbagai aplikasi yang membutuhkan waktu analisa singkat. Teknik ini merupakan pengembangan dari teknologi PCR dan memungkinkan untuk dilakukan suatu deteksi serta kuantitasi produk PCR. Teknik ini didukung oleh penggunaan *probe* oligonukleotida yang didesain agar dapat berhibridisasi dengan sekuens target. Pemotongan *probe* pada proses PCR (gambar 3) terjadi karena akitivitas nuklease 5' yaitu Tag polimerase yang digunakan untuk mendeteksi amplifikasi produk target spesifik.

RT-PCR digunakan untuk menggandakan DNA target dari *template* mRNA dari suatu organisme yang dilakukan untuk tujuan mengetahui kuantitas DNA target, melihat kuantitasnya secara relatif, ekspresi gen (kuantifikasi mRNA), deteksi keberadaan DNA target, menentukan jenis SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), menentukan kurva  $T_m$  (*Melting Curve*), serta melakukan skrining *High Resolution Melting* (HRM).

Instrumen RT-PCR bekerja berdasarkan prinsip *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Perbedaan instrumen RT-PCR dengan PCR konvensional adalah dapat diamati proses penggandaan DNA target secara *real-time* dari satu siklus PCR ke siklus selanjutnya tanpa harus melakukan elektroforesis untuk melihat hasilnya.

Untuk menunjang tujuan tersebut, dalam *running* RT-PCR, dibutuhkan komponen DNA target atau cDNA hasil isolasi, enzim reverse transcriptase, primer, *probe* atau *non-probe* yang dilabel pewarna fluoresen sehingga dapat dideteksi oleh instrumen, enzim DNA Polimerase serta larutan buffer reaksi.

### ***One step and two step* PCR**

RT-PCR dapat dikerjakan melalui dua metode, metode pertama berjalan dengan tahap *reverse transcription* (RT) di dalam tube yang sama dengan reaksi PCR. Metode tersebut dikenal dengan nama *one step* RT-PCR. Metode lainnya diawali dengan sintesis cDNA menggunakan *template* mRNA melalui reaksi *reverse transcription* kemudian cDNA yang diperoleh diamplifikasi menggunakan reaksi PCR. Metode ini disebut dengan *two step* RT-PCR.

Keunggulan dari *one step* RT-PCR adalah waktu yang dibutuhkan lebih singkat, lebih murah untuk digunakan dan lebih sedikit perlakuan terhadap sampel sehingga mengurangi resiko kesalahan dan kontaminasi akibat pemipetan berulang. Pada metode *one step* digunakan primer spesifik gen target sejak awal reaksi dan kedua proses yaitu RT serta PCR dikerjakan dalam satu tabung reaksi sehingga gen lain tidak ikut diamplifikasi. Sedangkan kelebihan utama metode *two step* RT-PCR adalah penggunaan random heksamer atau primer oligo dT pada reaksi RT (sintesis cDNA) sehingga memungkinkan terjadinya konversi seluruh mRNA dalam sampel menjadi cDNA yang dapat digunakan untuk pengujian gen lain atau disimpan.

Umumnya, pemilihan metode *one step* atau *two step* didasarkan pada apakah dibutuhkan stok cDNA untuk digunakan pada analisa lanjutan atau tidak. Di samping itu faktor lain yang dijadikan sebagai dasar pemilihan metode RT-PCR yaitu karakteristik primer (spesifik gen, random heksamer atau oligo dT), dimana jenis primer berbeda yang digunakan saat reaksi RT memberikan tingkat sensitivitas dan efisiensi yang berbeda. Hal ini tidak hanya berdampak pada jalannya analisa sampel dalam RT-PCR namun juga pada kurva standar yang dihasilkan. Bustin dan Nolan mengungkapkan bahwa linearitas kurva standar yang dihasilkan dari *template*

dengan primer spesifik gen lebih baik dibandingkan menggunakan random heksamer.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### A. Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah mRNA yang diisolasi dari Kultur Sel MDA-MB-231 yang dimiliki oleh Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekular Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

### B. Prosedur Kerja

Pada penelitian ini prosedur kerja terbagi menjadi beberapa tahap yaitu :

#### Isolasi mRNA dari Kultur sel MDA-MB-231

Sel MCF7 MDA-MB-231 yang telah di sentrifugasi dan diambil supernatannya. Ditambahkan 0,5 ml *Tripure isolation reagen* pada tube, sel dihomogenisasikan dengan pemipetan dan diinduksi selama 5 menit pada suhu ruang (15-25°C) untuk memastikan terjadinya disosiasi sepenuhnya dari kompleks nukleoprotein pada homogenat. Setelah itu ke dalam tube ditambahkan kloroform 0,1 ml dan dilakukan pencampuran menggunakan vorteks selama 15 detik. Kemudian campuran diinkubasi dalam suhu 15- 25° C selama 2-15 menit. Setelah melakukan inkubasi, sampel di sentrifugasi pada kecepatan 12.000 x g selama 15 menit dengan suhu 2-8°C. Akan terbentuk 3 fraksi terpisah antara RNA, DNA dan Protein. RNA berada di bagian paling atas, lapisan tidak berwarna dan jernih. Fraksi RNA dipindahkan ke dalam tube yang baru dengan cara dipipet. Dipastikan lapisan keruh di bawahnya yang berisi DNA tidak terbawa. Kemudian ditambahkan isopropanol 0,25 ml ke dalam tube dan dicampur dengan cara membalik tabung berulang kali sebanyak 5-10 kali. Kemudian tube diinkubasi selama 5-10 menit dalam suhu 15-25°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 10 menit dalam suhu 2-8°C. Pelet dipisahkan dengan cara membuang supernatan. Pelet dalam tabung ditambahkan 0,5 ml etanol 75% untuk pencucian. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.500 x g selama 5 menit dalam suhu 2-8° C. Selanjutnya supernatan dibuang dan tube dikeringkan selama 5-10 menit. Resuspensi pelet menggunakan *RNAse free water* (RFW) 40 µl. Kemudian campuran diinkubasi selama 10-15 menit

dalam suhu 55-60°C. RNA yang telah diisolasi dapat disimpan dalam *deep freezer* pada suhu -80 °C sampai digunakan kembali untuk analisis.

### **Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi RNA**

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi RNA menggunakan nano drop dan hasilnya dibandingkan dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer konvensional. Sampel mRNA sejumlah 2 µL diukur serapannya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm menggunakan nanodrop. Sedangkan untuk pengukuran menggunakan spektrofotometer sampel diencerkan terlebih dahulu untuk memenuhi volume kuvet yang digunakan. Perhitungan konsentrasi dan kemurnian mRNA dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Konsentrasi RNA =  $A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{DF}$  (pengenceran)
- Kemurnian RNA =  $A_{260}/A_{280}$ .

Berdasarkan kit isolasi yang digunakan, kemurnian RNA dicapai jika rasio  $A_{260}$  terhadap  $A_{280}$  berada dalam rentang 1,6 – 2,0

### **Sintesis dan amplifikasi cDNA dengan teknik *two steps* RT-PCR**

Sintesis cDNA dikerjakan dalam dua jumlah mRNA total yang berbeda. Sintesis cDNA dijalankan dalam reaksi siklik dengan tahapan annealing, polimerisasi dan inaktivasi panas. cDNA yang diperoleh diukur konsentrasinya menggunakan nanodrop. Tahap selanjutnya adalah amplifikasi cDNA yang diperoleh. PCR dikerjakan untuk dua template cDNA yang disintesis dari jumlah total mRNA 100 ng dan 500 ng. Sentrifuse campuran pada kecepatan 3.000 rpm selama 2 menit. Tube ditempatkan di dalam instrumen PCR. Setelah reaksi selesai, dilakukan analisa data

## **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penggunaan sel line kanker payudara dalam penelitian sangat bermanfaat, terutama untuk mengamati ekspresi gen spesifik yang menjadi penanda keganasan kanker. Pada praktikum digunakan sel line MDA-MB-231 dengan karakteristik triple negatif, yaitu tidak memiliki reseptor hormon estrogen, progesteron serta HER2. Perubahan ekspresi gen MnSOD pada sel line tersebut dibandingkan dengan sel punca kanker payudara CSA-ALDH menjadi sasaran dalam praktikum. Aktivitas MnSOD dibutuhkan oleh sel untuk melindunginya dari stres oksidatif dengan cara



mengkatalisis perubahan superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen.

Analisa terhadap perubahan ekspresi MnSOD diawali dengan isolasi mRNA MnSOD dari sel line MDA-MB-231. Isolasi dilakukan dengan menggunakan *Tripure isolation kit* yang dapat memisahkan tiga komponen penting didalam sel yaitu RNA, DNA dan protein dalam waktu bersamaan. Kit ini efisien untuk digunakan dalam isolasi ketiga komponen diatas dan waktu yang dibutuhkan dalam pengerjaan sangat singkat. Kandungan dari kit isolasi adalah senyawa fenol dan guanidin tiosianat, dimana guanidin tiosianat merupakan suatu *chaotropic agent* yang mampu memutuskan ikatan hidrogen pada makromolekul sehingga dapat melisis sel. Fenol bersama dengan kloroform dapat mendenaturasi protein, terutama protein yang mengikat DNA sehingga DNA dapat terbebas. Pada isolasi ini, keasamaan dari reagen berada pada rentang 4-6 dengan tujuan untuk memisahkan DNA dari RNA. Di pH tersebut DNA akan berada di dalam fasa organik sedangkan RNA terlarut di dalam fasa cair. Hal ini disebabkan oleh struktur molekul DNA yang mengandung dua atom H bebas pada karbon nomor 2 dan 3 sehingga akan mudah dinetralkan pada suasana asam. Sedangkan RNA memiliki satu gugus hidroksil pada atom C nomor 3 yang cenderung lebih stabil pada suasana asam. Kloroform mempertajam pemisahan fasa cair dan organik karena kloroform memiliki densitas lebih tinggi dibandingkan fenol ( $1,47 \text{ g/cm}^3$ ) sehingga keduanya tidak dapat tercampur dan membentuk dua fasa terpisah.

Konfirmasi terhadap baik ataupun tidaknya teknik pengerjaan isolasi RNA dapat diamati melalui perhitungan kemurnian RNA. Pada praktikum ini dibandingkan dua pengukuran absorbansi RNA yaitu melalui nanodrop dan spektrofotometer. Meskipun prinsip dasar kedua alat tersebut sama, namun nanodrop memiliki keunggulan dalam penggunaannya antara lain hanya dibutuhkan jumlah sampel yang sedikit dalam analisa, akurasi lebih tinggi dan dapat secara langsung mengitung kemurnian molekul yang dianalisa. Kemurnian RNA yang diperoleh melalui pembacaan nanodrop sebesar 1,605 dan spektrofotometer sebesar 1,767. Merujuk pada referensi kit isolasi, rentang kemurnian RNA adalah

1,6 – 2,0 sehingga dapat disimpulkan RNA yang dihasilkan bebas dari kontaminasi DNA maupun protein.

Teknik yang diaplikasikan pada praktikum ini adalah two steps qRT-PCR dimana sintesis cDNA dan amplifikasinya dilakukan dalam dua tabung yang berbeda dan reaksi yang terpisah. Seperti telah dijelaskan, bahwa melalui metode *two steps* ini diperoleh cDNA yang dapat disimpan untuk analisa gen target lain dengan menambahkan primer spesifik ke dalam campuran. *Template* mRNA yang diujikan sebanyak 100 ng dan 500 ng, dengan tujuan untuk melihat kualitas hasil cDNA yang diperoleh jika menggunakan total mRNA yang berbeda tersebut. Penggunaan referensi berupa *housekeeping gene* sangat dianjurkan dalam teknik PCR sebagai kalibrasi pengukuran ekspresi gen. *Housekeeping gene* diekspresikan di seluruh sel untuk mempertahankan viabilitas dan fungsi normal sel.

Kelebihan utama dari two step RT-PCR adalah digunakan random heksamer atau primer oligo dT dalam reaksi RT di tube terpisah. Prosedur ini memungkinkan terjadinya konversi seluruh mRNA dalam sampel menjadi cDNA yang dapat digunakan untuk pengujian gen lain selanjutnya atau disimpan. Sehingga tidak hanya dihasilkan cDNA dari gen target saja, namun bermacam-macam cDNA di dalam satu tube. Metode ini sangat bermanfaat apabila gen target yang akan dianalisa lebih dari satu jenis.

Dalam analisa kuantifikasi relatif, digunakan sel kontrol dimana hasil Ctnya akan dinormalisasi menjadi satu. Pada penelitian ini CSA-ALDH dijadikan sel kontrol. Setelah dilakukan analisa dan perhitungan ekspresi MnSOD sel uji dan kontrol, diperoleh hasil bahwa ekspresi relatif gen MnSOD pada sel MDA-MB-231 nilainya sebesar 0,320 dimana nilai tersebut berada di bawah sel kontrol yaitu CSA-ALDH. Artinya terjadi penurunan ekspresi gen MnSOD pada sel MDA-MB-231 yang menandakan keganasan kanker pada sel tersebut jika dibandingkan dengan sel punca kanker. Penurunan ekspresi berkorelasi positif dengan penurunan aktivitas enzim MnSOD di dalam sel. MnSOD tidak mampu menangkal onkogen ataupun radikal yang ada dan sifat MnSOD sebagai tumor suppresor ditekan atau down

regulasi. Sebagai akibatnya perkembangan sel tumor menjadi tidak terkendali dan mengarahkan pada keganasan.

Hasil yang jauh berbeda ditunjukkan oleh ekspresi relatif MnSOD yang berasal dari *template* mRNA dengan jumlah 500 ng. Nilai ekspresi MnSOD yang diperoleh sebesar 33,797 jauh berada di atas nilai ekspresi sel kontrol. Perbedaan pola ekspresi ini diduga disebabkan oleh ketidaksesuaian antara primer spesifik yang digunakan saat sintesis cDNA dengan gen referensi. Primer yang digunakan adalah oligo dT dimana gen referensi adalah 18S (ribosomal RNA). Oligo dT hanya dapat berikatan/hibridisasi dengan RNA yang mempunyai poliA di ujung 3', dan RNA dengan karakteristik tersebut adalah mRNA. Sedangkan 18 S adalah ribosomal RNA yang tidak memiliki poliA sehingga efektivitas dan spesifisitas hibridisasi primer akan berkurang dan akibatnya cDNA yang dihasilkan lebih sedikit. Hal ini terlihat dari nilai cycle treshold (Ct) gen 18S yang lebih besar dibandingkan gen MnSOD atau dengan kata lain cDNA yang dihasilkan dari RNA 18S jauh lebih sedikit dibandingkan cDNA dari mRNA MnSOD. Untuk itu, pada teknik RT-PCR, pemilihan primer harus disesuaikan dengan penggunaan *housekeeping gene* agar hasil yang diperoleh dapat terkalibrasi secara sesuai.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

##### 4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang ekspresi gen MnSOD yang diberikan pada cell line MDA-MB-231 dengan menggunakan teknik quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) menunjukkan terjadi penurunan ekspresi gen MnSOD pada sel MDA-MB-231 sebesar 0,320 dibandingkan dengan control sel punca kanker payudara CSA-ALDH.

##### 4.2 Saran

1. Dalam melakukan teknik qRT-PCR, agar diperhatikan kesesuaian pemilihan primer spesifik dan housekeeping gene sebagai referensi.
2. Perlu dilakukan konfirmasi gen dengan menggunakan metode elektroforesis untuk memastikan gen teramplifikasi dengan optimal.

## 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini sampai selesai.

## 6. DAFTAR PUSTAKA

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*;100:3983–8.
- American Type Culture Collection. Thawing, propagating and cryopreserving protocol. (2012). Manassas, VA. 1-25 p.
- Crocker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. (2009). *J. Cell Mol Med.*; 13(8B):2236-52
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359–86.
- Kim A. Modulation of MnSOD in cancer: epidemiological and experimental evidences. *Off J Korean Soc Toxicol.* 2010;26(2):83–93.
- Luo J. Manganese Superoxide Dismutase ( MnSOD ). Iowa City; 2001.
- Shigdar S, Lin J, Li Y, Yang CJ, Wei M, Zhus Y, et al. Cancer stem cell targeting: the next generation of cancer therapy and molecular imaging. (2012) *Ther Deliv.*;3(2):227–44.
- Spillane JB, Hendersen MA. Cancer stem cells: A Review. (2007) *ANZ J. Surg*; 77: 464–468.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. (2012). *Cell Stem Cell*;10(6):717–28.
- Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. (2008). *Nat Rev Cancer*;8(10):755–68.
- Wacker MJ, Godard MP. Analysis of One-Step and Two-Step Real-Time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech.* 2005;16(3):266–71.
- Yu F, Liu Q, Liu Y. Breast cancer stem cell. (2011). Sun Yat-Sen University;1