



Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U

UNIVERSITAS INDONESIA

**ASPEK HIPOKSIA PADA REGENERASI JARINGAN:
EKOR CECAK RUMAH (*Hemidactylus platyurus*) YANG MEMILIKI
DAYA REGENERASI TINGGI SEBAGAI MODEL**

DISERTASI

TITTA NOVIANTI

NPM:1306363456

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM DOKTOR ILMU BIOMEDIK**

JAKARTA

SEPTEMBER 2018

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U



UNIVERSITAS INDONESIA

**ASPEK HIPOKSIA PADA REGENERASI JARINGAN:
EKOR CECAK RUMAH (*Hemidactylus platyurus*) YANG MEMILIKI
DAYA REGENERASI TINGGI SEBAGAI MODEL**

DISERTASI

**Untuk memperoleh gelar Doktor
Program Studi Biomedik
Universitas Indonesia**

Jumat, 28 September 2018, pukul 09.00 WIB

Titta Novianti

NPM:1306363456

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM DOKTOR ILMU BIOMEDIK**

JAKARTA

SEPTEMBER 2018

Universitas
Esa Unggul

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Titta Novianti
NPM : 1306363456

Tanda Tangan :

Tanggal :



28 September 2018

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa Unggul

HALAMAN PERSETUJUAN

Disertasi ini diajukan oleh :
Nama : Titta Novianti
NPM : 1306363456
Program Studi : Biomedik
Judul Disertasi : Aspek hipoksia pada regenerasi jaringan: ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) yang memiliki daya regenerasi tinggi sebagai model

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Promotor : Prof. dr. Mohamad Sadikin, D.Sc. (.....)
Kopromotor : Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS (.....)
: Dr. rer. nat. Evy Ayu Arida (.....)
Tim Penguji : dr. Ahmad Aulia Jusuf, AHK, PhD. (Ketua) (.....)
: Dr. rer. Phsyol. dr. Septelia Inawati Wanandi (anggota) (.....)
: drh. Vetrizah Juniantito, PhD. APVet. (anggota) (.....)
: Dr. Rini Puspitaningrum, M. Biomed. (anggota) (.....)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 28 September 2018

Mengetahui,

Ketua Program Doktor Ilmu Biomedik

Prof. Dr. dr. Frans D. Sujatna, SpFKK (.....)



Allah berfirman dalam Al-Qur'an:

"Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu. Adapun orang-orang yang beriman, maka mereka yakin bahwa perumpamaan itu benar dari Tuhan mereka, tetapi mereka yang kafir

mengatakan : "Apakah maksud Allah menjadikan ini untuk perumpamaan?." Dengan perumpamaan itu banyak orang yang disesatkan Allah, dan dengan perumpamaan itu (pula) banyak orang yang diberi-Nya petunjuk. Dan tidak ada yang disesatkan Allah kecuali orang-orang yang fasik."

(QS. Al-Baqoroh: 26)

*Salam takzím untuk kedua orangtuaku
dan almarhum suamí tercinta
Rindu kami tak bertepi.....
Salam penuh cinta untuk anak-anakku*

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmannirrahiim

Alhamdulillahirrabbi'alamiin, puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala, atas segala rahmat dan karuniaNya, serta limpahan RahimNya saya dapat menyelesaikan pendidikan program Doktor, serta dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan Disertasi ini di Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa kekuatan doa, bantuan, bimbingan, dan motivasi dari berbagai pihak atas penyusunan Laporan Akhir Disertasi ini, mustahil dapat saya selesaikan sendiri. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada berbagai pihak yang telah banyak berkontribusi dalam penyelesaian Laporan Akhir Disertasi ini.

Bakti dan hormat saya kepada kedua orangtua, mamah dan papap yang telah melimpahkan kasih sayangnya serta doa yang tak pernah putus di akhir sujud malamnya. Semoga Allah menjaga beliau dan melimpahkan seluruh rahmatNya. Baktiku pada almh dan alm ibu bapak mertua yang telah menghadap Illahi Robbi, serta suami tercinta, alm Ir. Sugeng Sukarsono, yang telah banyak memotivasi dan melimpahkan kasih sayangnya, yang telah meninggalkan kami di saat saya tengah berjuang menyelesaikan studi S3 ini. Semoga Allah memberikan tempat mulia untuk ibu bapak mertua dan suami tercinta.

Penghormatan dan terimakasih kepada Rektor Universitas Indonesia Prof. Dr. Ir. Muhamad Anis, M. Met., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Prof. Dr. dr. Ari Fahrial Syam Sp.PD-KGEH, MMB, yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengajukan disertasi ini dan menyelesaikan program Doktor Ilmu Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Terimakasih yang mendalam kepada Ketua Program Doktor Ilmu Biomedik, Prof. Dr. dr. Frans Suyatna, SpFK., yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan studi pada Program Doktor Ilmu Biomedik, sekretaris Program PDIB FKUI, Dr. Melva Louisa Apt., M. Biomed. dan dr. Radiana D. Antarianto, M. Biomed, PhD., yang telah banyak memotivasi saya untuk segera menyelesaikan pendidikan Doktor ini.

Tak lupa saya sampaikan terimakasih mendalam kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, periode 2013-2017 Dr. dr. Ratna Sitompul, Sp.M(K), yang telah memberikan kesempatan untuk menimba ilmu di Program Doktor Ilmu Biomedik, serta Ketua dan Sekretaris Program Doktor Ilmu Biomedik FKUI periode 2010-2015 Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc. dan Dr. rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi atas kesempatan dan bimbingan yang diberikan kepada saya dalam menempuh Program Pendidikan Doktor ini.

Penghormatan terdalam dan rasa terimakasih berlimpah kepada Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc. selaku Promotor dan Pembimbing Akademik yang telah memberikan ide luar biasa dalam penelitian ini, serta senantiasa menyediakan waktunya untuk berdiskusi di tengah kesibukan beliau, mengarahkan metode penelitian hingga membimbing penulisan disertasi ini, disertai nasihat berharga serta motivasi untuk menuntut ilmu sungguh-sungguh.

Terimakasih dari lubuk hati terdalam dan hormat saya kepada Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS. selaku ko-promotor yang sabar, serta penuh keibuan telah membimbing, berdiskusi, mengarahkan, dan memperkaya tulisan, serta berbagi ilmu di bidang Hipoksia sehingga saya berhasil menyelesaikan penelitian dan menyelesaikan pemulisan disertasi ini.

Terimakasih tak terhingga serta hormat saya sampaikan kepada Dr. rer. nat. Evy Ayu Arida, yang telah banyak membantu dan membimbing saya sehingga dapat melakukan penelitian di laboratorium Zoologi Puslit Biologi LIPI Cibinong, serta membuka cakrawala saya untuk mengenal morfologi, sifat, dan tingkah laku hewan reptil lebih dalam.

Tidak lupa terimakasih banyak saya sampaikan kepada dr. Radiana D. Antarianto, M.Biomed, PhD. yang telah membimbing saya dalam kuliah kekhususan dan membimbing dalam metoda pembuatan sediaan Histologi dan Imunohistokimia, sehingga menambah wawasan saya dalam teknik ini.

Terimakasih tak terhingga kepada seluruh tim penguji, drh. Vetrizah Juniantito, PhD. yang telah bersedia membimbing saya selama pembuatan sediaan Imunohistokimia di Laboratorium Patologi Anatomi FKH IPB; dr. Ahmad Aulia, PhD. yang telah bersedia membimbing dalam pengamatan sediaan histologi dan imunohistokimia di tengah kesibukan beliau yang luar biasa; Dr rer. physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi,

yang telah banyak memberi masukan yang sangat berharga, serta Dr. Rini Puspitaningrum, S.Si, M.Biomed. atas segala diskusi dan masukannya.

Ucapan terimakasih tak lupa disampaikan kepada Direktorat Riset & Pengabdian Masyarakat Universitas Indonesia (DRPM UI), yang telah memberikan hibah Riset UI tahun 2015 dan Hibah Tugas Akhir Doktor tahun 2018, sehingga saya terbantu dalam menyelesaikan tugas akhir Doktor ini. Kemenristek DIKTI yang telah memberikan beasiswa BPPDN 2013, sehingga saya berhasil menempuh Program Doktor di bidang Ilmu Biomedik.

Terimakasih mendalam dan hormat saya kepada Ketua Yayasan Kemala Bangsa Universitas Esa Unggul, ibu Dr. Suryanti T. Arief, SH, MBA, M.Kn. serta Direktur Managing Yayasan Kemala Bangsa Bapak Dr. Yanuar Ramadhan, SE., MM., Ak., CA. yang telah banyak memberikan dukungan baik moril dan materil, sehingga saya dapat menyelesaikan tugas akhir Doktor ini.

Rasa hormat dan terimakasih banyak kepada Rektor Universitas Esa Unggul, Dr. Ir. Arief Kusuma Among Praja, MM., MBA, beserta para Wakil Rektor Universitas Esa Unggul yang telah memberikan kesempatan serta motivasinya sehingga saya dapat menuntut ilmu di Program Doktor Ilmu Biomedik FKUI dan menyelesaikannya.

Terimakasih yang tulus dan tak terhingga kepada Dekan Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan Universitas Esa Unggul, Dr. Aprilita Rina Yanti, Apt., M.Biomed., beserta Wakil Dekan dan para Ketua Program Studi yang telah memberikan dukungan selama saya menuntut ilmu di Program Doktor Ilmu Biomedik FKUI.

Rasa terimakasih tak terhingga dan ucapan yang sangat tulus untuk rekan-rekan di Program Studi Bioteknologi Universitas Esa Unggul, Dr. Henny Saraswati M.Biomed., Seprianto M.Si., Adri Nora M.Si., Radisti PhD, Febriana Dwi Wahyuni, M.Si., Ariyo Prabowo MT., yang telah bersedia membantu tugas keseharian saya selama saya menyelesaikan disertasi ini, serta teman-teman dosen di lingkungan FIKES dan Universitas Esa Unggul, yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan dukungan dan doanya sehingga saya berhasil menyelesaikan Disertasi ini.

Rasa terimakasih yang sangat tulus kepada Bapak Setia Permana, PhD. beserta bu Mieke yang telah bersedia menyumbangkan ilmunya dan banyak membantu dalam penyelesaian statistika. Terimakasih tak lupa saya sampaikan kepada Dr. Amir Hamidy dan Dr. Marlina Adriyani dari LIPI Cibinong yang telah membantu mendesain primer

DNA; Aroem Naroeni, PhD.; Jeanne Elvia Christian, M.Biomed.; Eleya Fariyah M.Biomed. serta teman-teman di PRVKP FKUI yang telah membantu dalam metoda *Western Blot*; Dr. Sabar Pambudi dari BPPT yang juga telah membantu teknik *Western Blot*.

Terimakasih banyak dan rasa haru mendalam kepada teman-teman S3 di program Ilmu Biomedik FKUI yang telah memberikan semangat dan motivasinya, sehingga saya telah menyelesaikan tugas akhir Doktor ini, kepada Dr. dr. Riwanti Estiasari Sp.S.; Dr. dr. Tri Novita, M. Biomed.; Dr. dr. Syarifah Dewi M. Biomed.; Dr. Conny Riana Tjampakasari MS.; Dr. drg. Masagus Zainuri M. Biomed.; dr. Tena Djuartina M. Biomed.; dr. Fauzul Husna M.Biomed.; dr. Yudhistirawaty MARS Sp.KK.; Dr. dr. Purnama M.Biomed.; dr. Yulia Ariani Sp.A; dr. Ria Syafitri M.Biomed.; dr. Saptuti Chunaeni M.Biomed.; Yuni Rukminiati M.Biomed.; Widoretno M.Si.; dr. Arie Munandar Sp.Onk. Rad., Pratiwi M. Biomed, serta rekan-rekan S3 lainnya.

Tak lupa untuk Pak Zaki Zakaria, Nova Rina Ardila, ST. dan Yunita Puspita Sari Sn, beserta seluruh staf di PDIB FKUI, terimakasih mendalam dan tak putus, yang banyak membantu selama perkuliahan dan ujian Program Doktor ini, sehingga semua berjalan lancar. Juga tak lupa kepada Mba Erna di Departemen Biokimia, Mba Ike dan Mas Ali di Departemen Histologi FKUI, Mba Kiki dan pak Kasnadi di FKH IPB, Pak Mulyadi di Lab Zoologi LIPI, terimakasih yang mendalam saya haturkan, yang telah banyak membantu penelitian di laboratorium sehingga penelitian saya dapat berjalan dengan baik dan lancar.

Teruntuk anak-anakku tercinta, belahan jiwaku, terimakasih yang mendalam dan doa ibu untuk kalian semoga dapat meneruskan cita-cita ayah, teruntuk Alfin Zulfikar, Hilmy Dzulkifli, Farah Zafirah dan Nashwa Zahida, jangan lelah untuk menuntut ilmu dan belajar. Tak lupa adik-adik tercinta Ammy Ramdhanita, Tya Tania Asri, dan Mira Wulandari S.I.P. M.Eng., serta untuk adik-adik iparku Ir. Syarif Hidayat MT, Rahardjo, dan Anam Masrur, beserta seluruh keponakanku tercinta terimakasih yang tulus atas segala doa dan dukungannya yang tak pernah putus. Terimakasih pula kepada seluruh kakak ipar, adik ipar, beserta keponakan dari alm suami, keluarga besar Rahmat Atmijoyo atas segala doanya.

Jazakumullah khoir untuk sahabat-sahabatku ibu-ibu Aisyah yang tak henti-hentinya terus memotivasi dan mendoakan saya hingga tugas akhir ini dapat saya

selesaikan. Terimakasih tak terhingga untuk sahabat-sahabat Biologi 88 UI, yang banyak memberikan semangat dan motivasi yang sungguh berarti.

Rasa haru dan terimakasih mendalam untuk sahabat tercinta Dr. Retno Lestari M. Si dan Dr Marlina Adriyani yang banyak membantu dan memotivasi sehingga rangkaian penelitian dan tugas akhir ini dapat terselesaikan.

Terimakasih tak henti dan mendalam untuk sahabat-sahabat almarhum suami di Flying Club Pondok Cabe, Bapak Ir. Sigit Hendrawan Samsu, Bapak Letkol. Mar. Untung Medianto, serta Bapak Sigit Sudarmadji, atas segala perhatian, bantuan, serta motivasinya yang tulus, semoga silaturahmi ini tidak putus.

Serta semua fihak yang tidak saya sebutkan satu persatu, yang telah banyak membantu, memotivasi dan mendoakan hingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.

Akhir kata, saya berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tugas akhir Disertasi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu Kedokteran khususnya dan ilmu pengetahuan umumnya.

Jakarta, September 2018

Penulis

Universitas
Esa Unggul

Universitas
Esa U

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

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

Nama : Titta Novianti
NPM : 1306363456
Program Studi : Ilmu Biomedik
Fakultas : Kedokteran

Jenis karya : Skripsi/Tesis/Disertasi/ Karya Ilmiah Lainnya* : .
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non eksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Aspek hipoksia pada regenerasi jaringan: Ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) yang memiliki daya regenerasi tinggi sebagai model.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : 2 April 2018

Yang menyatakan,


(Titta Novianti)

*Karya Ilmiah: karya akhir, makalah non seminar, laporan kerja praktek, laporan magang, karya profesi dan karya spesialis

ABSTRAK

Nama : Titta Novianti
Program Studi : Program Doktor Ilmu Biomedik
Judul : Aspek hipoksia pada regenerasi jaringan: Ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) yang memiliki daya regenerasi tinggi sebagai model
Pembimbing : Prof. dr. Mohamad Sadikin, DSc.; Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS; Dr. rer. nat. Evy Ayu Arida

Latar Belakang: Pada proses regenerasi jaringan terjadi ketidakseimbangan antara kebutuhan oksigen dengan suplai oksigen yang menyebabkan jaringan mengalami hipoksia relatif. Keadaan hipoksia diduga memiliki peran penting dalam proses regenerasi jaringan. Pada penelitian ini, dianalisis ekspresi protein dan gen yang berperan mengatasi keadaan hipoksia (HIF-1 α dan HIF-2 α), protein yang berperan dalam suplai oksigen (Cygb), protein yang menstimulasi biogenesis mitokondria (PGC-1 α) serta enzim yang mampu menangkal radikal bebas (MnSOD) pada regenerasi jaringan. Regenerasi jaringan ekor pada cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) digunakan sebagai model dalam penelitian ini, karena merupakan hewan yang paling dekat secara taksonomi dengan mamalia yang memiliki daya regenerasi tinggi, dibandingkan vertebrata lain dengan kemampuan sama. Diharapkan penelitian ini dapat menjadi model dalam mempelajari proses regenerasi dalam upaya pengembangan terapi penyembuhan luka.

Metode: Penelitian bersifat eksperimental deskriptif menggunakan jaringan 30 ekor cecak hasil regenerasi pada hari ke 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30 setelah autotomi dengan 3 kali pengulangan pada setiap pengamatan. Cecak diperoleh dari lingkungan laboratorium Zoologi Puslit Biologi LIPI Cibinong. Analisis ekspresi gen dilakukan dengan metoda qRT-PCR; analisis ekspresi protein dinilai dengan metoda *Western Blot* dan imunohistokimia, serta dilakukan analisis struktur histologi jaringan dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Penelitian dilakukan di Laboratorium Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI; laboratorium Histologi FKUI, laboratorium PRVKP FKUI, dan laboratorium Patologi Anatomi FKH IPB. Penelitian dalam kurun waktu tahun 2015-2018.

Hasil penelitian: Grafik pertumbuhan jaringan ekor cecak menghasilkan pola pertumbuhan yang lambat pada 13 hari pertama, pertumbuhan yang sangat cepat hari ke 13 sampai ke 21, dan kembali lambat sampai hari ke 30. Pada awal pertumbuhan, ekspresi HIF-1 α dan HIF-2 α tinggi menunjukkan jaringan dalam keadaan hipoksia. Tingginya ekspresi Cygb selama proses regenerasi jaringan dari awal hingga akhir pengamatan menunjukkan perannya untuk mengakomodasi oksigen selama proses regenerasi berlangsung. Ekspresi PGC-1 α yang tinggi di awal proses dan tetap dipertahankan sampai akhir pengamatan berperan untuk mempertahankan agar energi untuk proses regenerasi dapat terpenuhi melalui biogenesis mitokondria. Tingginya ekspresi MnSOD dalam jaringan pada awal regenerasi diduga memiliki peranan yang berkaitan dengan netralisasi senyawa radikal dalam jaringan.

Kesimpulan: HIF 1 α , HIF 2 α , Cygb, PGC 1 α dan MnSOD masing-masing memiliki peran penting tersendiri dalam proses regenerasi jaringan.

Kata kunci: HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, MnSOD, PGC-1 α .

ABSTRACT

Name : Titta Novianti
Study Program : Biomedical Science Doctoral Program
Title : Aspects of hypoxia on tissue regeneration: The tail of common House gecko (*Hemidactylus platyurus*) which has high Regeneration as a model

Background: In tissue regeneration there is an imbalance between oxygen demand and supply causes the tissue to experience relative hypoxia. Hypoxia is thought to have an important role in the tissue regeneration. This research analyzed the expression of proteins and genes that play role in overcoming hypoxia (HIF-1 α dan HIF-2 α); the protein involved in oxygen supply (Cygb); the protein that stimulates mitochondrial biogenesis (PGC-1 α); and the enzyme counteract free radicals (MnSOD). The regeneration of house gecko's tail (*Hemidactylus platyurus*) was used as a model in this research, because it is the taxonomically closest animal to mammals that have a high capability in regeneration, compared to other vertebrates with the same ability. Hence, this study might become a model in studying tissue regeneration as an effort in developing a wound healing treatment.

Method: The research was performed in a descriptive experimental way, using 30 geckos, having undergone regeneration on day 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; and 30 after autotomy. The experiment used 3 repetitions for each observation. House geckos were obtained from the laboratory building of Zoology Research Center of Indonesian Institute of Sciences (LIPI) Cibinong and its surrounding area. The analysis for gene expression was performed using qRT-PCR method; the analysis for protein expression was undertaken using *Western Blot* method and immunohistochemistry. In addition to these, the structure analysis for the tissue histology was performed using Haematoxylin and Eosin (H&E) staining method. The study was conducted in the Laboratory of the Department of Molecular Biochemistry & Biology FKUI; Laboratory of the Department of Histology FKUI; laboratory of the Institute of Human Virology & Cancer Biology FKUI; and laboratory of Pathology Anatomy of Animal Medicine, Institute of Agriculture Bogor, in the year 2015-2018.

Results: The graph for the growth of the gecko tail tissue exhibits a slow growth pattern for the first 13 days, followed by a very swift growth between day 13 to 21, returning to slow growth afterwards until day 30. In the early growth stage, the expression of HIF-1 α and HIF-2 α were increased which showed the tissue was in hypoxia state.

HIF protein regulates the contributing to the tissue regeneration process, leading to the increasing growth of tissue with the correlation values of $r = -0,853$ for HIF-1 α ; $r = -0,75$ The substantial expression of Cygb observed throughout the process of tissue regeneration indicates its role in accommodating oxygen in the regeneration process. The expression of PGC-1 α was observed to be high in the early stages of the process and remain so until the process ends. This indicates its function in maintaining that sufficient energy provided by mitochondrial biogenesis is available for the regeneration process. The high level of MnSOD expression in the tissue in the early stage of regeneration is thought to relate to its role in neutralizing radicals inside the tissue.

Conclusion: HIF 1 α , HIF 2 α , Cygb, PGC 1 α and MnSOD have their own important roles in the tissue regeneration process.

Keywords: HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, MnSOD, PGC-1 α .

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	Hal i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	x
ABSTRAK	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR TABEL	xx
DAFTAR GRAFIK	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Hipotesis Penelitian	5
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.4.1 Tujuan Umum	5
1.4.2 Tujuan Khusus	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
1.5.1 Bidang Akademik.....	6
1.5.2 Bidang Pengabdian Masyarakat	6
1.5.3 Bidang Pengembangan Penelitian	6
1.6 Batasan Penelitian	6
1.7 Model Operasional Penelitian	6
1.8 Kerangka Teori	7
1.9 Kerangka Konsep	8
2. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Regenerasi	9
2.1.1 Kemampuan Regenerasi Pada Hewan	11
2.1.2 Kemampuan Regenerasi Jaringan Pada reptile	13
2.2 Hipoksia	15
2.2.1 <i>Hypoxia Inducible Faktor -1 alpha (HIF-1α)</i>	16
2.2.2 <i>Hypoxia Inducible Faktor- 2 alpha (HIF-2α)</i>	19
2.2.3 Sitoglobin	20
2.2.4 Mitokondria	24
2.2.5 <i>Superoxida dimustase</i>	26
2.3 Cecak Rumah (<i>Hemidactylus platyurus</i>)	27
2.3.1 Jenis-jenis cecak	27
2.3.2 Taksonomi dan Penyebaran Cecak Rumah	28
2.3.3 Adaptasi Morfologi dan Anatomi	29
2.5.4 Adaptasi Tingkah Laku	30

3. METODOLOGI PENELITIAN	32
3.1 Strategi Penelitian	32
3.2 Bahan Penelitian	32
3.2.1 Sampel	32
3.2.2 Bahan	36
3.2.3 Alat Penelitian	37
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	37
3.4 Prosedur Penelitian	37
3.4.1 Mengukur panjang ekor cecak	37
3.4.2 Isolasi RNA total jaringan ekor cecak	38
3.4.2.1 Penilaian kemurnian mRNA	39
3.4.2.2 Desain Primer	39
3.4.3 Teknik Western Blot (WB)	41
3.4.4 Pembuatan Sediaan Histologi	42
3.4.5 Pembuatan Sediaan imunohistokimia	43
3.4.6 Analisis semi kuantitatif sediaan histologi dan Imunohistokimia.....	44
3.4.6.1 Penghitungan semi kuantitatif sediaan imunohistokimia	44
3.4.6.2 Penghitungan semi kuantitatif sediaan HE dengan Program <i>Image J-I46</i>	45
3.5 Analisis Statistik	47
3.6 Alur Penelitian	48
4. HASIL PENELITIAN	49
4.1 Pertumbuhan Panjang Ekor Cecak	49
4.2 Analisis Histologi Regenerasi Jaringan	50
4.2.1 Perbandingan pertumbuhan jaringan keseluruhan	51
4.2.2 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 1 setelah autotomi	52
4.2.3 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 3 setelah autotomi	53
4.2.4 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 5 setelah autotomi	54
4.2.5 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 8 setelah autotomi	55
4.2.6 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 10 setelah autotomi	56
4.2.7 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 13 setelah autotomi	57
4.2.8 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 17 setelah autotomi	58
4.2.9 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 21 setelah autotomi	59
4.2.10 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 25 setelah autotomi ...	60
4.2.11 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 30 setelah autotomi ...	61
4.3 Data kuantitatif sediaan histologi	62
4.3.1 Ketebalan epidermis dan dermis	62
4.3.2 Data luas jaringan tulang rawan	64
4.3.3 Densitas sel mirip fibroblast dan sel saraf	66
4.4 Analisis sediaan imunohistokimia	68
4.4.1 Protein HIF-1 α	68
4.4.2 Protein HIF-2 α	69
4.4.3 Protein Cygb	70
4.5 Analisis immunoratio hasil imunohistokimia	71
4.5.1 Protein HIF-1 α	71
4.5.2 Protein HIF-2 α	72

4.5.3 Protein Cygb	72
4.6 Analisis Western Blot	73
4.6.1 Protein HIF-1 α	74
4.6.2 Protein HIF-2 α	74
4.6.3 Protein Cygb	75
4.7 Analisis Ekspresi mRNA	75
4.7.1 Ekspresi relatif mRNA HIF-1 α	75
4.7.2 Ekspresi relatif mRNA HIF-2 α	76
4.7.3 Ekspresi relatif mRNA Cygb	77
4.7.4 Ekspresi relatif mRNA PGC-1 α	78
4.7.5 Ekspresi relatif mRNA MnSOD	79
4.8 Korelasi antar variabel	80
4.8.1 Korelasi antara mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD dengan panjang ekor	80
4.8.2 Korelasi antara presentase immunoratio protein HIF-1 α , HIF- 2 α , dan Cygb dengan panjang ekor	81
4.8.3 Korelasi mRNA HIF-1 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecak	82
4.8.4 Korelasi antara presentase immunoratio protein HIF-1 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecak	83
4.8.5 Korelasi antara mRNA HIF-2 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecak	84
4.8.6 Korelasi antara presentase immunoratio protein HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	85
4.8.7 Korelasi antara presentase immunoratio protein Cygb dengan kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	86
4.9 Rangkuman Hasil Penelitian	87
4.9.1 Analisis perbandingan kurva pertumbuhan data kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	87
4.9.2 Perbandingan keseluruhan ekspresi mRNA dan protein	88
4.9.3 Perbandingan rentang waktu ekspresi mRNA, protein, dan histologi jaringan ekor cecak	90
5. PEMBAHASAN	92
5.1 Pertumbuhan panjang ekor cecak rumah	92
5.1.1 Pertumbuhan jaringan ekor dari hari ke 1 sampai hari ke 13....	93
5.1.2 Pertumbuhan jaringan ekor dari hari ke 13 sampai hari ke 21....	95
5.1.3 Pertumbuhan jaringan ekor dari hari ke 21 sampai hari ke 25....	96
5.2 Peranan HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	97
5.2.1 Peranan HIF-1 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	97
5.2.2 Peranan HIF-2 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	100
5.2.3 Peranan Cygb pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	101
5.2.4 Peranan PGC-1 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak	102

rumah	103
5.2.5 Peranan MnSOD pada proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	104
5.3 Rangkuman proses regenerasi jaringan ekor cecak rumah	104
6. KESIMPULAN DAN SARAN	106
6.1 Kesimpulan	106
6.2 Saran	106
DAFTAR PUSTAKA	107
LAMPIRAN	115
DAFTAR SINGKATAN	140

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 1.1 Kerangka Teori	7
Gambar 1.2 Kerangka Konsep Penelitian	8
Gambar 2.1 Kurva proses penyembuhan luka	9
Gambar 2.2 Regenerasi jaringan pada kaki salamander	12
Gambar 2.3 Perbandingan histologi pertumbuhan jaringan ekor baru kadal hijau (<i>Anolis carollinensis</i>)	14
Gambar 2.4 Regulasi HIF-1 α oleh enzim PHD pada kondisi hipoksia dan normoksia	16
Gambar 2.5 Struktur tiga dimensi protein HIF-1 α yang mengikat ARNT	17
Gambar 2.6 Struktur gen HIF-1 α	18
Gambar 2.7 Struktur protein HIF-2 α terdiri atas HIF 2 PAS dan ARNT.	19
Gambar 2.8 Struktur protein Cygb pada manusia	20
Gambar 2.9 Struktur mitokondria dan letak mitokondria dalam sel	22
Gambar 2.10 Transport elektron pada mitokondria	24
Gambar 2.11 Proses biogenesis mitokondria	25
Gambar 2.12 Jenis-jenis cecak	28
Gambar 2.13 Proses autotomi pada bagian pangkal ekor cecak rumah	31
Gambar 3.1 Cecak rumah (<i>Hemidactylus platyurus</i>)	33
Gambar 3.2 Kandang cecak	34
Gambar 3.3 Anatomi tubuh cecak	35
Gambar 3.4 Cecak yang telah mengalami regenerasi pada ekornya	36
Gambar 3.5 Cara pengukuran panjang ekor hasil regenerasi	38
Gambar 3.6 Proses <i>scanning</i> dengan perangkat lunak <i>Immunoratio</i> secara <i>online</i>	45
Gambar 3.7 Proses penghitungan jumlah sel pada sediaan dengan pewarnaan HE menggunakan perangkat lunak <i>Image J-I46</i>	46
Gambar 3.8 Penghitungan luas sel dengan menggunakan perangkat lunak <i>Image J-I46</i>	47
Gambar 3.9 Bagan alur penelitian	48
Gambar 4.1 Pertumbuhan panjang ekor cecak rumah (<i>Hemidactylus platyurus</i>) pada regenerasi pasca autotomi hari ke 1 sampai hari ke 30	49
Gambar 4.2 Diagram batang rata-rata pertumbuhan panjang ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30 setelah autotomi	50
Gambar 4.3 Perbandingan jaringan ekor secara keseluruhan hasil proses regenerasi jaringan dari hari ke 1 sampai hari ke 30.....	52
Gambar 4.4 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 1 setelah autotomi..	53
Gambar 4.5 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 3 setelah autotomi ..	54
Gambar 4.6 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 5 setelah autotomi ..	55
Gambar 4.7 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 8 setelah autotomi ..	56
Gambar 4.8 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 10 setelah autotomi.	57
Gambar 4.9 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 13 setelah autotomi	58
Gambar 4.10 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 17 setelah autotomi	59

Gambar 4.11	Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 21 setelah autotomi	60
Gambar 4.12	Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 25 setelah autotomi	61
Gambar 4.13	Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 30 setelah autotomi	62
Gambar 4.14	Rata-rata tebal epidermis (mm) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	63
Gambar 4.15	Rata-rata tebal dermis (mm) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	64
Gambar 4.16	Rata-rata luas tulang rawan matang (mm ²) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	65
Gambar 4.17	Rata-rata luas tulang rawan belum matang (mm ²) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	66
Gambar 4.18	Rata-rata densitas sel saraf pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	67
Gambar 4.19	Rata-rata densitas sel mirip fibroblas pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 30	67
Gambar 4.20	Analisis sediaan imunohistokimia protein HIF-1 α	68
Gambar 4.21	Analisis sediaan imunohistokimia protein HIF-2 α	69
Gambar 4.22	Analisis sediaan imunohistokimia protein Cygb	70
Gambar 4.23	Rata-rata presentase immunoratio protein HIF-1 α pada sediaan imunohistokimia	71
Gambar 4.24	Rata-rata presentase immunoratio protein HIF-2 α pada sediaan imunohistokimia	72
Gambar 4.25	Rata-rata presentase immunoratio protein Cygb pada sediaan imunohistokimia	73
Gambar 4.26	Hasil uji Western Blot protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb	73
Gambar 4.27	Hasil Uji Western Blot protein HIF-1 α dari hari ke 1 sampai hari ke 30	74
Gambar 4.28	Hasil Uji Western Blot protein HIF-2 α dari hari ke 1 sampai hari ke 30	74
Gambar 4.29	Hasil Uji Western Blot protein Cygb dari hari ke 1 sampai hari ke 30	75
Gambar 4.30	Ekspresi mRNA HIF-1 α relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke 1 sampai hari ke 30	76
Gambar 4.31	Ekspresi mRNA HIF-2 α relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke 1 sampai hari ke 30	77
Gambar 4.32	Ekspresi mRNA Cygb relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke 1 sampai hari ke 30	78
Gambar 4.33	Ekspresi mRNA PGC-1 α relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke 1 sampai hari ke 30	79
Gambar 4.34	Ekspresi mRNA MnSOD relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke 1 sampai hari ke 30	80
Gambar 4.35	Korelasi antara ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD dengan pertumbuhan panjang ekor cecak rumah	81
Gambar 4.36	Korelasi antara presentase immunoratio protein HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb dengan pertumbuhan panjang ekor	82
Gambar 4.37	Korelasi antara mRNA HIF-1 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	83

Gambar 4.38	Korelasi antara presentase protein HIF-1 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	84
Gambar 4.39	Korelasi antara mRNA HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	85
Gambar 4.40	Korelasi antara presentase protein HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	86
Gambar 4.41	Korelasi antara presentase protein Cygb dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak	87
Gambar 4.42	Kurva perbandingan data kuantitatif histologi pertumbuhan ekor cecak pada pengamatan hari ke 1-30	88
Gambar 4.43	Grafik perbandingan ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD	89
Gambar 4.44	Kurva perbandingan rata-rata presentase protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb	90

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kelompok gen target yang diregulasi oleh HIF-1 α	Hal 18
Tabel 2.2	Klasifikasi ilmiah cecak rumah	28
Tabel 3.1	Sekuen DNA primer gen HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD, dan 18S rRNA cecak rumah (<i>Hemidactylus platyurus</i>)	40
Tabel 4.1	Perbandingan rentang waktu ekspresi mRNA dan protein dengan histologi jaringan ekor cecak	91

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1
Lampiran 2

Daftar Riwayat Hidup
Data Penelitian

Hal
115
120

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang.

Regenerasi jaringan sangat penting bagi makhluk hidup, terutama pada saat mengalami kerusakan jaringan atau organ. Proses regenerasi diharapkan mampu memperbaiki jaringan atau organ yang mengalami kerusakan, sehingga dapat beraktivitas kembali dan menjalankan fungsi seperti semula. Oleh karena itu proses regenerasi jaringan bersifat esensial bagi kelangsungan makhluk hidup.¹ Regenerasi jaringan dalam ilmu biologi adalah proses pembaharuan, restorasi, serta pertumbuhan genom, sel, dan organisme.²

Beberapa hewan tingkat rendah, seperti planaria, hidra, spons, *coelenteratae*, dan cacing, memiliki daya regenerasi yang sangat tinggi sehingga mampu mengganti anggota tubuhnya yang luka atau bahkan hilang.³ Pada vertebrata, kemampuan regenerasi tersebut sangat terbatas dan kemampuan ini berbeda-beda untuk setiap kelompok. Ikan memiliki kemampuan regenerasi pada bagian distal sirip, kecebong memiliki kemampuan regenerasi pada ekor dan kaki belakang.⁴ Amfibia lain, seperti urodela dan salamander mampu memulihkan anggota tubuhnya saat dewasa.⁵ Kelompok reptil, seperti cecak dan kadal memiliki daya regenerasi tinggi pada ekornya, setelah mengalami autotomi sebagai upaya perlindungan diri dari predator.⁶ Pada area autotomi ekor kadal terdapat jaringan lemak yang kaya akan sel punca mesenkim serta banyak terdapat sel saraf yang memiliki peran pada proses regenerasi jaringan.^{5,6,7}

Pada mamalia, termasuk manusia, daya regenerasi jaringannya sangat terbatas, hanya mampu memperbaiki sebagian kecil saja dari jaringan yang mengalami kerusakan. Kerusakan tersebut terbatas hanya pada organ kulit, hati, dan juga akhir-akhir ini ditemukan pada susunan saraf pusat.⁸ Regenerasi jaringan pada organ hati terjadi saat mengalami trauma atau terpapar zat toksik, yang akan memicu sel-sel hati bermitosis untuk beregenerasi.² Demikian pula halnya pada organ kulit, lapisan germinativum memiliki kemampuan regenerasi saat jaringan mengalami kerusakan atau secara berkala epidermis kulit paling luar akan digantikan oleh lapisan germinativum hasil pembelahan.⁹ Demikian pula halnya dengan sel neuron yang terdapat pada organ kulit yang mengalami cedera, akan segera beregenerasi secara spontan.⁸

Proses regenerasi jaringan pada organisme multiseluler sangat diperlukan untuk memperbaiki jaringan atau organ tubuhnya sehingga dapat mempertahankan sifat fisiologi dan morfologi organ. Proses regenerasi jaringan meliputi proses proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, dan morfogenesis. Pada dasarnya, proses regenerasi dimediasi oleh proses regulasi molekuler, gen, dan protein.¹ Proses regenerasi akan sempurna jika jaringan baru yang terbentuk mempunyai morfologi dan fungsi yang sama dengan jaringan yang hilang, sedangkan proses regenerasi tidak lengkap jika setelah terbentuk sel nekrotik, maka terbentuk jaringan fibrosis.¹⁰

Proses regenerasi jaringan akibat luka akan dimulai dengan proses penyembuhan luka. Peristiwa ini terbagi lagi dalam tiga tingkat yaitu inflamasi, granulasi, dan kontraksi luka yang prosesnya terjadi secara tumpang tindih.¹¹ Inflamasi terjadi pada 24 jam pertama yang ditandai dengan adanya kerusakan dan disintegrasi jaringan di area luka. Granulasi ditandai dengan adanya proliferasi sel fibroblas dan sel endotel serta pembentukan lapisan epidermis baru. Tahap selanjutnya adalah kontraksi luka yang ditandai dengan proses migrasi sel endotel membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis). Pada tingkat kontraksi luka terjadi migrasi dan proliferasi sel fibroblas serta sel makrofag. Sel fibroblas akan mensekresikan faktor pertumbuhan yang akan merangsang pembentukan matriks ekstra seluler, sedangkan sel makrofag berperan membersihkan jaringan dari sisa matriks ekstraseluler. Pada tahap ini terjadi keseimbangan antara produksi matriks ekstraseluler dengan degradasi ekstraseluler, sehingga terjadi pembentukan jaringan baru bersamaan dengan tahap pematangan jaringan.^{1,2}

Keseluruhan proses regenerasi jaringan memerlukan energi dalam jumlah besar, yang dapat diperoleh melalui proses metabolisme aerob. Peningkatan metabolisme aerob akan meningkatkan keperluan akan oksigen secara tajam, sehingga jaringan akan berada dalam keadaan hipoksia relatif, artinya walaupun keadaan lingkungan cukup O₂, dengan terjadinya kenaikan kebutuhan energi yang tajam, maka jaringan akan kekurangan O₂.¹³

Telah diketahui, sel-sel pada makhluk multiseluler dilengkapi dengan perangkat molekuler untuk mengatasi keadaan hipoksia. Suatu faktor transkripsi yang dikenal dengan nama *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) adalah suatu protein dimer, yang akan naik kadarnya jika sel mengalami hipoksia. Protein HIF yang pertama kali ditemukan adalah

HIF-1 α oleh Semenza dan Wang sekitar pertengahan tahun 1990an.¹³ Dikenal 3 isoform subunit- α HIF, yaitu HIF-1 α , HIF-2 α , dan HIF-3 α .¹⁴

Dalam keadaan hipoksia, makhluk hidup akan berusaha memenuhi kebutuhan selnya akan oksigen sehingga proses metabolisme aerob dapat tetap berlangsung. Oksigen yang diperoleh dengan berbagai cara ini harus disimpan secara efisien. Suatu cara untuk tujuan tersebut adalah dengan mengikatnya secara erat. Telah diketahui, di luar sel darah merah juga terdapat analog hemoglobin monomer yang berbeda-beda di berbagai jaringan. Di luar jaringan otot dan saraf, terdapat analog hemoglobin yang tersebar di berbagai jaringan lain. Analog hemoglobin ini disebut sitoglobulin (cytoglobin, Cygb).^{15,16}

Peningkatan metabolisme aerobik tercermin dengan meningkatnya jumlah mitokondria, sebab mitokondria merupakan organel pengguna oksigen untuk menghasilkan energi dalam jumlah besar.¹⁷ Perubahan jumlah mitokondria dapat diperkirakan dengan mengukur senyawa petanda keberadaan mitokondria seperti enzim suksinat dehidrogenase atau komponen mitokondria seperti sitokrom c.¹⁸ Selain itu, biogenesis mitokondria merupakan petunjuk bahwa sel sedang melakukan penambahan jumlah mitokondria untuk memenuhi keperluan akan peningkatan energi. Tingginya kebutuhan akan energi sering terjadi saat jaringan sedang beregenerasi. Pada kondisi tersebut, energi sangat diperlukan untuk sejumlah proses regulator dan biosintesis, oleh karena itu biogenesis mitokondria sangat diperlukan selama proses regenerasi jaringan.¹⁹

Mitokondria memiliki peran penting dalam proses metabolisme sel dengan menghasilkan energi. Selain itu, mitokondria juga menghasilkan senyawa oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species* atau ROS). Senyawa ROS merupakan senyawa yang berbahaya bagi sel, namun sel memiliki senyawa antioksidan yang mampu menetralkannya. Salah satunya adalah senyawa mangan superoksida dismutase (MnSOD).²⁰

Penelitian tentang ekspresi gen, protein, serta struktur sel dalam keadaan hipoksia serta peranannya pada proses regenerasi jaringan masih sangat terbatas. Penelitian ini sangat penting sebagai penelitian awal dalam dunia Kedokteran untuk menganalisis aspek hipoksia pada proses regenerasi jaringan. Pada penelitian ini digunakan cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) sebagai hewan model, karena cecak memiliki daya regenerasi sangat tinggi pada ekornya setelah mengalami autotomi (pemutusan ekor). Selain itu

cecak merupakan kelompok hewan vertebrata yang paling dekat dengan mamalia dibandingkan hewan vertebrata lain yang memiliki daya regenerasi tinggi (kelompok ikan dan amfibi). Area autotomi ekor cecak kaya akan sel punca dan sel saraf yang berperan penting pada proses regenerasi jaringan ekor. Keberadaan cecak rumah sangat mudah ditemukan di sekitar lingkungan kita. Adaptasi tingkah laku dan pola makan memungkinkan cecak rumah mudah untuk dipelihara. Daya regenerasi ekor cecak yang sangat tinggi, dengan struktur jaringan yang lengkap sama halnya dengan organ pada anggota gerak mamalia, sehingga memungkinkan hewan ini dapat digunakan sebagai model penelitian tentang aspek hipoksia pada proses regenerasi jaringan dengan kerangka teori pada gambar 1.1 dan kerangka konsep penelitian pada gambar 1.2.

1.2 Rumusan masalah

Penelitian mengenai proses regenerasi jaringan sangat penting bagi manusia sebagai upaya penyembuhan cedera pada jaringan atau organ. Penelitian berbagai aspek yang berperan pada proses regenerasi jaringan masih terus dilakukan dengan menggunakan berbagai hewan model. Cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) adalah hewan yang memiliki daya regenerasi tinggi serta tingkat kekerabatan dekat dengan mamalia, dibandingkan hewan tingkat rendah lainnya. Pada ekor cecak rumah, banyak terdapat sel punca dan sel saraf pada area autotomi, yang berperan dalam proses regenerasi jaringan. Aktivitas sel yang tinggi dalam proses regenerasi jaringan menyebabkan ketidakseimbangan ketersediaan oksigen dengan kebutuhan akan oksigen yang semakin tinggi. Ketidakseimbangan tersebut dapat menyebabkan keadaan hipoksia relatif dalam jaringan. Maka permasalahan pada penelitian ini adalah bagaimana aspek hipoksia pada proses regenerasi jaringan dengan menggunakan ekor cecak sebagai model? Apakah terjadi peningkatan ekspresi gen/protein pada keadaan hipoksia yang diduga berperan dalam regenerasi jaringan? Bagaimana kaitan antara ekspresi ke lima gen yang diteliti (HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD) dengan pertumbuhan jaringan pada proses regenerasi jaringan ekor cecak?

1.3 Hipotesis Penelitian

1. Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak diduga terjadi keadaan hipoksia yang menyebabkan protein HIF-1 α dan HIF-2 α stabil.
2. Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak dibutuhkan suplai oksigen yang tinggi sehingga diduga terjadi peningkatan ekspresi *Cygb*
3. Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak kebutuhan energinya yang tinggi, maka diduga terjadi peningkatan biogenesis mitokondria dan peningkatan ekspresi PGC-1 α .
4. Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak diduga terjadi peningkatan ekspresi MnSOD akibat peningkatan proses metabolisme aerob dan kondisi hipoksia.
5. Perubahan ekspresi gen dan keberadaan protein tersebut diduga memiliki peran mengatasi keadaan hipoksia sehingga berkaitan dengan perubahan struktur histologi dan keberadaan sel yang berperan dalam proses regenerasi jaringan ekor cecak.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan umum

Memperoleh pengetahuan mengenai peran hipoksia secara molekuler dan histologis serta kaitannya pada proses regenerasi jaringan dengan menggunakan ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) sebagai model

1.4.2 Tujuan khusus:

1. Memperoleh gambaran secara kualitatif dan kuantitatif mengenai ekspresi gen dan protein HIF-1 α , HIF-2 α , *Cygb*, gen PGC-1 α , dan gen MnSOD pada keadaan hipoksia selama proses regenerasi jaringan setelah peristiwa autotomi pada ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*).
2. Memperoleh gambaran berbagai sel yang muncul dan perubahan jaringan yang terjadi secara struktur histologi selama proses regenerasi jaringan pada ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*).
3. Memperoleh kaitan antara gambaran histologi dan sel yang berperan dalam proses regenerasi jaringan dengan aspek hipoksia selama proses regenerasi jaringan

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat sebagai berikut,

1.5.1 Bidang akademik

Memperoleh pengetahuan mengenai peran hipoksia secara molekuler dan histologis serta kaitannya pada proses regenerasi jaringan

1.5.2 Bidang pengabdian masyarakat

1. Penerapan edukasi pada masyarakat pentingnya oksigen pada penanganan luka
2. Perlu dilakukan edukasi pada masyarakat tentang peranan berbagai sel dalam proses regenerasi jaringan

1.5.3 Bidang pengembangan penelitian

1. Merupakan data awal berbagai mekanisme molekuler yang dapat dikembangkan lebih lanjut mekanisme molekuler lainnya dalam proses regenerasi jaringan
2. Sebagai data awal untuk pengembangan terapi dalam proses regenerasi jaringan.

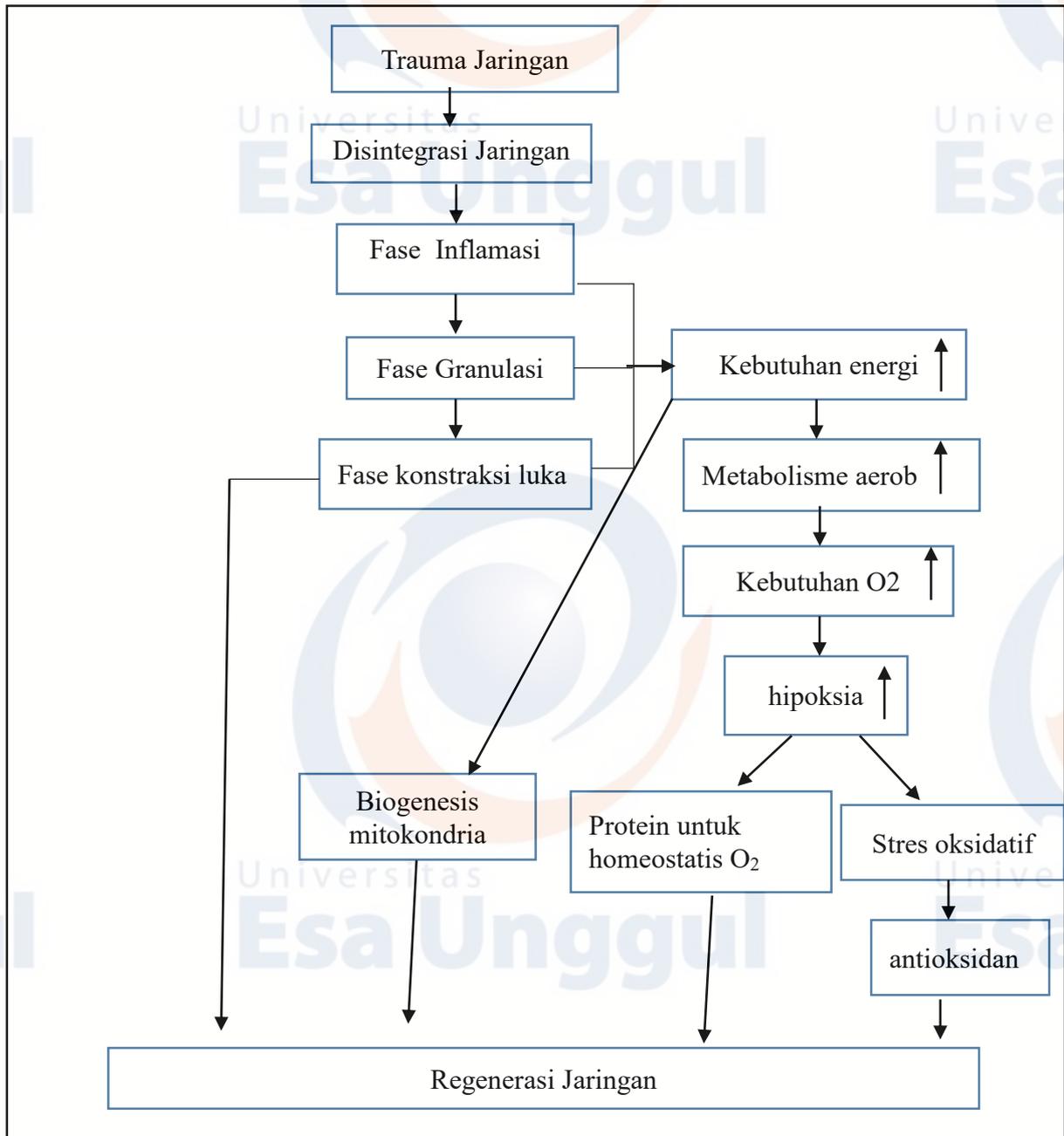
1.6 Batasan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk analisis aspek hipoksia pada proses regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*) sebagai model dengan indikator ekspresi gen dan keberadaan protein HIF-1 α , HIF-2 α , sitoglobin/Cygb, PGC-1 α , serta MnSOD yang diduga memiliki peran dalam mengatasi keadaan hipoksia dalam jaringan.

1.7 Model operasional Penelitian

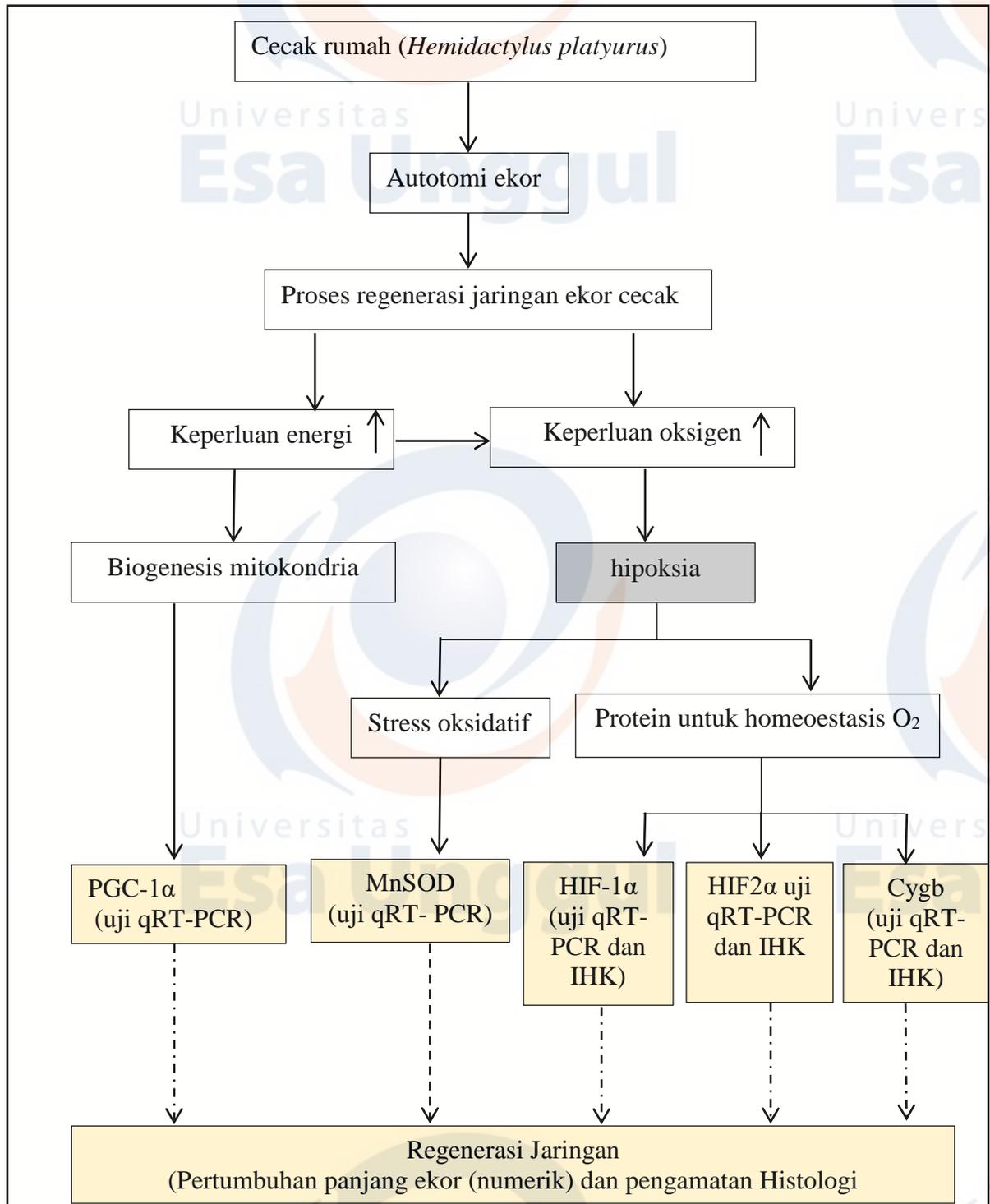
Penelitian dilakukan dengan metode qRT-PCR untuk analisis ekspresi mRNA, metoda Western Blot dan Imunohistokimia untuk analisis protein dan pewarnaan henatoksilin –eosin untuk sediaan histologi serta analisis semi kuantitatif dengan perangkat lunak *Immunoratio* dan *ImageJ* untuk sediaan histologi dan imunohistokimia.

1.8 Kerangka Teori



Gambar 1.1 Kerangka Teori

1.9 Kerangka Konsep



Gambar 1.2 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan : yang akan dianalisis

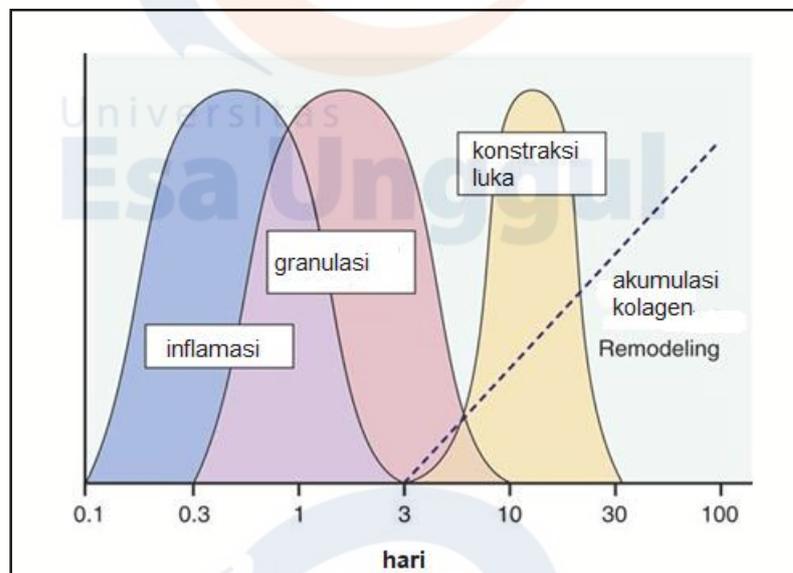
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Regenerasi

Regenerasi jaringan merupakan upaya organisme untuk memperbaiki jaringan yang mengalami cedera melalui pertumbuhan jaringan baru menggantikan jaringan rusak kembali ke keadaan normal. Regenerasi jaringan diharapkan dapat memulihkan struktur dan fungsi jaringan sehingga organisme tersebut dapat beraktivitas kembali seperti sedia kala.²¹

Proses regenerasi jaringan pada penyembuhan luka akan melibatkan tahap inflamasi, tahap granulasi, dan tahap kontraksi luka. Gambar 2.1, merupakan gambaran kurva proses penyembuhan luka yang terjadi secara tumpang tindih. Setelah jaringan mengalami cedera, maka jaringan akan mengalami inflamasi. Pada tahap inflamasi belum terjadi proses regenerasi jaringan, hanya terjadi proses penghentian aliran darah ke area cedera dengan membentuk gumpalan yang dipadatkan membentuk serat fibrin. Penggumpalan darah ini memerlukan faktor penggumpalan darah dan trombosit. Pada tahap inflamasi juga terjadi migrasi sel neutrofil dan makrofag yang berperan memfagositosis sel mati, serta membunuh bakteri di area cedera.^{11,22,23}



Gambar 2.1 Kurva proses penyembuhan luka jaringan
(modifikasi dari¹¹)

Tahap selanjutnya adalah granulasi yang ditandai dengan proliferasi sel fibroblas dan endotel, serta pembentukan lapisan epidermis baru. Jaringan granulasi terjadi selama

beberapa hari, dimulai dengan munculnya beberapa pembuluh darah kecil dan penyebaran sel fibroblas. Sel fibroblas sangat besar peranannya pada proses ini. Fibroblas akan aktif bermigrasi dari jaringan sekitar luka ke area luka, berproliferasi, dan mengeluarkan beberapa substansi yang berperan membentuk jaringan baru. Proses fagositosis oleh sel makrofag sangat berperan pada proses penyembuhan luka, karena dapat mengaktivasi fibroblas untuk mensintesis kolagen. Sintesis kolagen sangat diperlukan dalam proses reepitelisasi dan pembentukan pembuluh kapiler baru atau angiogenesis. Sel fibroblas dan keratinosit akan merangsang proses angiogenesis dan stimulasi matriks ekstraseluler. Sejumlah sel dan pembuluh darah baru yang terbentuk dalam jaringan baru disebut sebagai jaringan granulasi.^{3,24}

Fibroblas dan epidermis memiliki peranan besar dalam penyembuhan luka. Pada proses penyembuhan luka, sel basal lamina epidermis pada tepian luka akan terlepas dan berpindah menutupi permukaan luka, dan akan diganti oleh sel basal lamina lainnya hasil mitosis.^{1,11} Proses reepitelisasi adalah proses yang pertama kali tercetus untuk menutupi jaringan luka sehingga mencegah infeksi, serta mencegah hilangnya atau rusaknya epidermis maupun jaringan yang menjadi struktur di bawahnya. Fibroblas mensintesis kolagen yang memperkuat jaringan luka. Fibroblas berproliferasi dan lebih aktif mensintesis komponen ekstrasel jaringan ikat sebagai respons terhadap cedera. Sel epidermis akan membentuk lapisan epidermis tipis pertama secara terus menerus untuk menutupi area luka sehingga terbentuk jaringan epidermis baru.^{9,25}

Aktivitas utama dalam regenerasi jaringan adalah proliferasi sel. Pada regenerasi jaringan terjadi pembelahan sel secara terus-menerus. Sel baru yang terbentuk berasal dari sel punca yang akan berproliferasi dan menggantikan sel yang rusak atau mati. Setelah luka tertutup, semua jaringan yang terdapat di bagian dalam epidermis penutup luka, yaitu jaringan otot, tulang, tulang rawan, dan jaringan ikat mengalami disintegrasi serta kehilangan ciri karakteristiknya. Pada tahap ini semua jaringan mengalami dediferensiasi dengan timbulnya jaringan granulasi yang terdiri atas pembuluh darah baru dan sel fibroblas.¹¹

Tahap selanjutnya adalah kontraksi luka yang ditandai dengan migrasi sel endotel membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis) sehingga banyak membutuhkan matriks kolagen. Peristiwa angiogenesis dimulai dalam beberapa hari pertama setelah cedera. Pada proses regenerasi jaringan, pembuluh darah akan tumbuh memenuhi kebutuhan

fisiologi jaringan. Angiogenesis sangat dibutuhkan untuk keberhasilan terjadinya penyembuhan luka.^{11,25}

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tahap awal regenerasi terjadi peningkatan angiogenesis untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan oksigen agar proses proliferasi sel dan diferensiasi jaringan dapat berlangsung. Pada akhir tahap regenerasi, angiogenesis makin berkurang, sehingga regenerasi akan berhenti. Tahap akhir dari proses regenerasi jaringan adalah tahap maturasi atau tahap pematangan. Tujuan dari tahap maturasi adalah menyempurnakan terbentuknya jaringan baru menjadi jaringan sembuh yang kuat. Leukosit secara bertahap meninggalkan area luka. Fibroblas mulai meninggalkan jaringan granulasi, sehingga warna kemerahan pada jaringan mulai berkurang karena pembuluh darah mulai beregresi dan serat fibrin dari kolagen bertambah banyak untuk memperkuat jaringan. Sintesis kolagen yang telah dimulai sejak tahap proliferasi akan dilanjutkan pada tahap maturasi dengan pemecahan kolagen oleh enzim kolagenase. Kolagen muda yang terbentuk pada tahap proliferasi akan berubah menjadi kolagen yang lebih matang dan lebih kuat dengan struktur yang lebih baik. Pada proses penyembuhan yang optimal diperlukan keseimbangan antara kolagen yang diproduksi dengan yang dipecahkan.^{25,26}

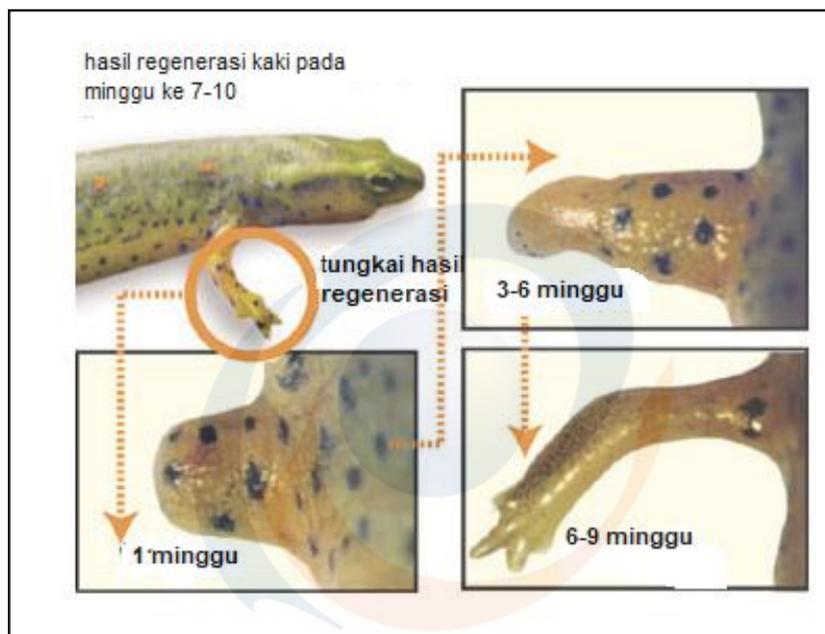
2.1.1 Kemampuan Regenerasi Pada Hewan

Hewan tingkat rendah baik avertebrata maupun vertebrata memiliki kemampuan regenerasi untuk memperbaiki secara ekstensif jaringan yang rusak akibat luka. Cacing pipih planaria, hidra, spons, *coelenteratae*, dan cacing tanah, memiliki daya regenerasi sangat tinggi dibandingkan dengan hewan vertebrata, karena mampu mengganti anggota badan atau ekornya yang hilang, bahkan membentuk individu baru.³ Hal yang berbeda terjadi pada serangga, jika tahap metamorfosis tidak sempurna, maka kemampuan untuk memperbaiki jaringannya menghilang. Beberapa hewan avertebrata memiliki kemampuan regenerasi pada tahap sebelum dewasa, namun saat dewasa daya regenerasi ini berkurang, seperti pada *Drosophila* dan *Tribolium*.²⁷

Beberapa hewan vertebrata memiliki daya regenerasi cukup tinggi pada organ tertentu. Ikan pada umumnya memiliki kemampuan regenerasi pada sirip ekornya, kecebong dan salamander memiliki kemampuan beregenerasi pada kaki belakangnya.

Pada hewan reptil, seperti cecak dan kadal daya regenerasi terdapat pada ekor yang mengalami autotomi sebagai upaya perlindungan diri dari predator.²⁸

Pada salamander, tampak pada Gambar 2.2, regenerasi tungkai kaki depan dimulai dengan pertumbuhan kulit di atas luka tersebut. Sel-sel punca yang belum terdiferensiasi tampak mirip dengan tunas pada embrio. Sel-sel punca tersebut diperkirakan berasal dari diferensiasi sel-sel khusus yang akan menjadi sel otot atau sel-sel tulang rawan serta jaringan lainnya sehingga menjadi jaringan kaki utuh.²⁹



Gambar 2. 2 Regenerasi jaringan pada kaki salamander. Pertumbuhan 1 minggu, 3-6 minggu, dan 7-10 minggu (modifikasi dari ²⁸)

Pada mamalia seperti manusia, tikus, dan mamalia lain, daya regenerasi sangat terbatas, hanya terdapat pada organ tertentu saja. Umumnya, pada tahap embrio seluruh jaringan hewan mamalia memiliki kemampuan regenerasi. Daya regenerasi mamalia pada tahap dewasa hanya terjadi pada sebagian kecil jaringan.² Kemampuan regenerasi tersebut terjadi akibat adanya medan morfogenesis. Medan morfogenesis ini sangat diperlukan pada proses regenerasi jaringan.¹

Daya regenerasi jaringan pada manusia hanya terjadi pada organ kulit, hati, dan baru-baru ini ditemukan daya regenerasi di Susunan Saraf Pusat.⁸ Kemampuan regenerasi pada manusia yang sangat terbatas ini, memicu para ilmuwan untuk mengembangkan berbagai teknologi dan metoda proses regenerasi jaringan di dunia kedokteran. Regenerasi jaringan di dunia kedokteran semakin berkembang pesat, dengan

ditemukannya berbagai metoda perekayasa untuk mengembalikan, memelihara, atau memperbaiki fungsi jaringan dan organ yang rusak.^{30,31,32}

2.1.2 Kemampuan Regenerasi jaringan pada reptil

Hewan reptil, seperti kadal, tokek, dan cecak memiliki daya regenerasi yang cukup tinggi pada ekornya. Ekor kadal, tokek, dan cecak akan mengalami peristiwa autotomi saat menghadapi ancaman dari luar. Proses autotomi adalah upaya memutuskan jaringan ekor, untuk mengelabui predator. Daerah autotomi kaya akan jaringan lemak dan bersifat sangat rapuh karena sedikit mengandung jaringan ikat, fibroblas, dan fibril kolagen.^{7,33}

Pada pangkal ekor reptil terdapat protein *Nerve Growth Factor* (NGF) yang berperan menumbuhkan sel saraf sebagai titik tumbuh ekor. Ekor yang terpotong pada areal NGF, akan tumbuh lebih cepat dibandingkan daerah ekor yang jauh dari area NGF. Proses autotomi pada ekor reptil dapat menyebabkan rusaknya jaringan ikat, jaringan otot, serta mengakibatkan inflamasi jaringan.³⁴

Pada reptil, proses regenerasi jaringan dibagi dalam empat tahap, yaitu tahap penyembuhan luka (0-10 hari regenerasi); tahap formasi tunas blastemal (11-15 hari); tahap pertumbuhan jaringan (15-25 hari); dan tahap pematangan (> 25 hari). Tahap penyembuhan luka merupakan tahap awal regenerasi jaringan yang banyak didominasi sel darah putih dan sel darah merah. Pada awal tahap ini, kerusakan pembuluh darah menyebabkan keluarnya trombosit yang berfungsi menyumbat vaskuler yang terbuka dan mengeluarkan substansi vasokonstriksi sehingga pembuluh darah kapiler mengalami penyempitan dan sel endotel akan saling menempel menutup pembuluh darah.^{6,10}

Deskripsi secara histologi regenerasi jaringan ekor kadal hijau (*Anolis Carolinensis*) tampak pada Gambar 2.3. Pada 10 hari pertama setelah autotomi merupakan tahap penyembuhan luka, epidermis baru akan terbentuk mulai pada hari ke 5 dan menutupi luka akibat autotomi. Pembuluh darah baru dengan segera terbentuk dan sel mesenkim pada lapisan dermis terakumulasi pada daerah autotomi di bawah epidermis dan dengan cepat menutupi area luka. Ketika sel mesenkim mencapai area antara dermis dan epidermis dan mengikat kedua lapisan tersebut, menyebabkan stimulasi sel punca dan dimulainya proses regenerasi jaringan di bagian bawah epitel. Sebelum epidermis

penutup luka terbentuk, tidak ada perubahan yang cukup signifikan. Pertumbuhan dimulai setelah epidermis penutup luka terbentuk dan pertumbuhan awal dimulai.^{6,28,35}

Pada hari ke 15-20 proses regenerasi jaringan ekor kadal hijau setelah autotomi, terjadi diferensiasi tulang rawan pada sumsum tulang dan otot skeletal. Pada hari ke 25, jaringan otot dan tulang rawan tumbuh terus mengelilingi ependimal pada sumsum tulang. Protein miosin rantai berat (*myosin heavy chain*, MHC) pada otot rangka tampak terekspresi di sepanjang ekor, kecuali di ujung distal. Peningkatan regenerasi jaringan ekor ini mencapai puncaknya pada hari ke 15-25.³³



Gambar 2.3 Perbandingan histologi pertumbuhan jaringan ekor baru kadal hijau (*Anolis carollinensis*). Pertumbuhan dimulai dari tahap penyembuhan luka sampai tahap pertumbuhan ekor secara utuh pada hari ke 30 setelah autotomi (modifikasi dari³⁶)

2.2 Hipoksia

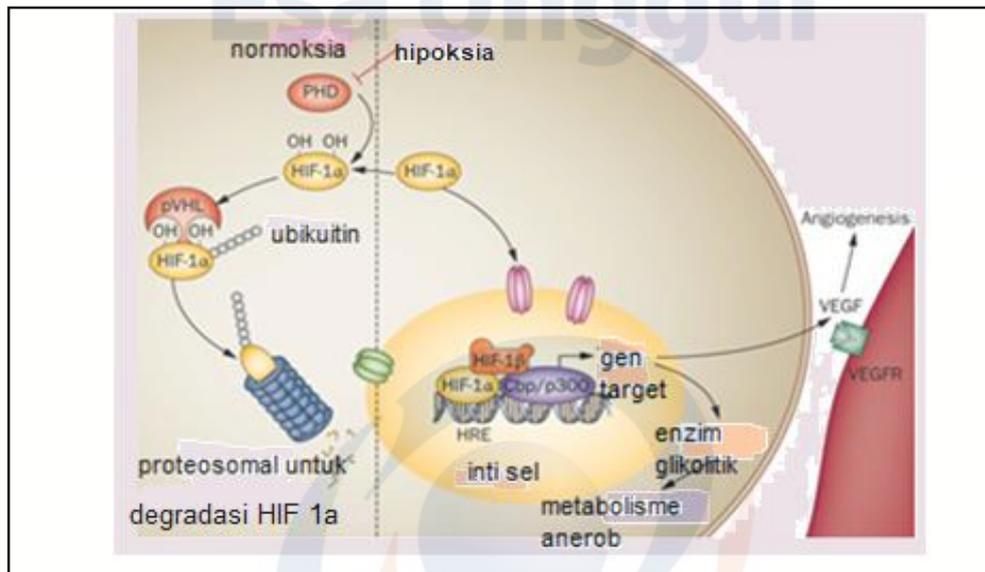
Keseluruhan proses dalam regenerasi jaringan memerlukan oksigen yang cukup tinggi, mengakibatkan ketidakseimbangan antara kebutuhan akan oksigen dan persediaan oksigen di jaringan. Lebih rendahnya persediaan oksigen dalam jaringan dibandingkan kebutuhan oksigen yang sangat tinggi menyebabkan keadaan hipoksia relatif. Kejadian hipoksia relatif pada jaringan luka terjadi dengan kadar oksigen sangat sedikit mencapai 1 %.³⁷

Keadaan hipoksia dapat menyebabkan kerusakan pada sel atau jaringan. Organisme memiliki kemampuan dalam mengatasi keadaan hipoksia dengan mempertahankan keadaan homeostatis baik pada tingkat sistemik atau tingkat sel. Salah satu cara mengatasi keadaan hipoksia adalah dengan adanya protein yang sangat sensitif terhadap kadar oksigen. Dalam kondisi hipoksia, enzim prolin hidroksilase (PHD) menjadi tidak aktif sehingga protein *Hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) menjadi stabil. HIF-1 α merupakan faktor transkripsi yang akan meregulasi gen-gen yang berkaitan dengan fungsi vital dalam sel, salah satunya adalah gen yang berperan dalam proses angiogenesis.^{13,38}

Terdapat 3 isoform subunit- α HIF, yaitu HIF-1 α yang ditemukan oleh Semenza dan Wang sekitar pertengahan tahun 1990an, HIF-2 α dan HIF-3 α . HIF-1 α dan HIF-2 α berperan pada hipoksia jaringan embrional dan dewasa. HIF-1 α berperan pada kondisi hipoksia akut sedangkan HIF-2 α lebih berperan pada kondisi hipoksia kronis. Ada pun peran HIF-3 α belum diketahui dengan jelas fungsinya. Stabilitas dan aktivitas sub unit- α sangat dipengaruhi oleh kadar oksigen dan diatur oleh beberapa modifikasi pasca translasi.^{13,39}

Molekul HIF-1 merupakan molekul heterodimer yang terdiri atas dari sub unit- α dan sub unit- β . Sub unit- β dikenal juga sebagai *aryl hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT) yang terdapat di dalam inti sel. Aktivitas HIF-1 β 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. Pada keadaan normoksia, sub unit- α akan mengalami hidroksilasi pada residu prolin spesifik oleh HIF-prolyl hidroksilase, yang menyebabkan ubiquitinasi sehingga sub unit- α tersebut didegradasi oleh sistem proteasom. Sebaliknya dalam keadaan hipoksia, hambatan hidroksilasi residu prolin akan menyebabkan HIF-1 α stabil sehingga

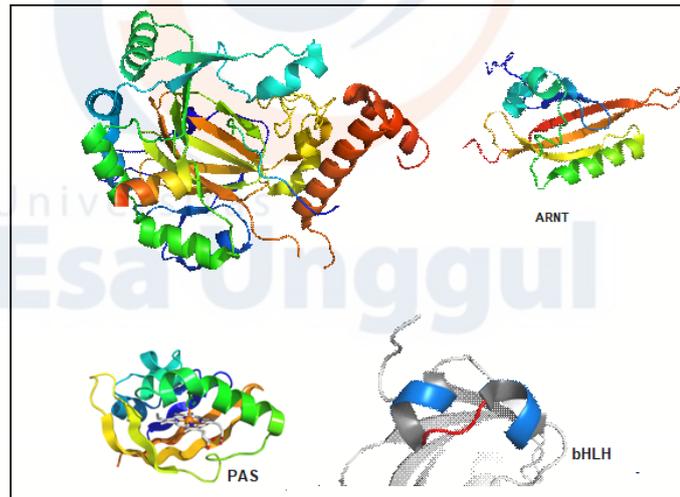
meningkatkan aktivitasnya sebagai faktor transkripsi gen-gen yang diregulasi dalam keadaan hipoksia. Dengan demikian, aktivitas HIF-1 dalam homeostasis oksigen sangat ditentukan oleh sub unit- α , yang dipertahankan dalam keadaan hipoksia dan didegradasi dalam keadaan normoksia (Gambar 2.4).^{40,41}



Gambar 2.4 Regulasi HIF-1 α oleh enzim PHD pada kondisi hipoksia dan normoksia (modifikasi dari³⁸)

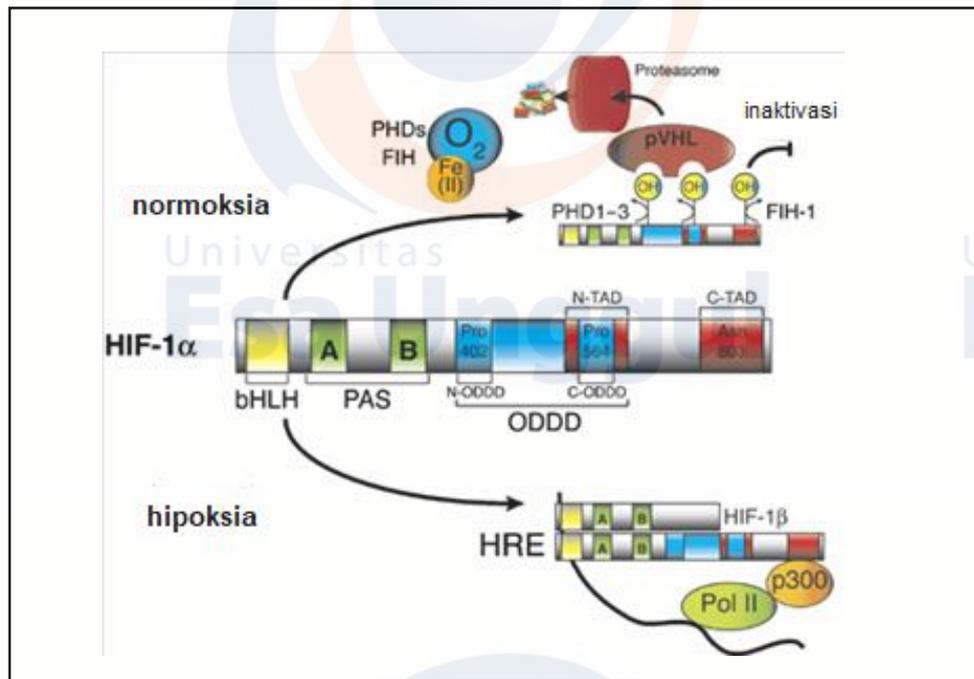
2.2.1. Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α)

HIF-1 α merupakan protein dengan struktur yang terdiri atas dua subunit pada bHLH-PAS protein famili, yaitu *Per and Sim* (PAS) dan *basic-helix-loop-helix* (bHLH) (gambar 2.5). Protein bHLH memiliki domain b, HLH, PAS, dan terminal transaktivasi (TAD), yang dapat mengatur transkripsi serta ekspresi gen target (Gambar 2.5).³⁸



Gambar 2. 5 Struktur protein HIF-1 α yang berikatan dengan ARNT (modifikasi dari³⁸)

Secara umum, motif bHLH-PAS sangat penting untuk memungkinkan pembentukan heterodimer antara subunit HIF-1 α dan HIF-1 β . Urutan DNA tersebut memungkinkan kedua protein tersebut dikenali oleh *Hypoxia Responsive Element* (HRE) pada gen target. HIF-1 α dan HIF-1 β memiliki struktur *basic helix-loop- helix* (bHLH) - *Per-Arnt –Sim* (PAS) yang bersifat lestari.⁴² Terdapat tiga situs hidroksilasi pada sub unit HIF-1 α , dua residu prolil terhidroksilasi pada *oksigen-dependent degradation domain* (ODDD) oleh PHD dan satu residu asparaginil pada domain *C-terminal transactivation* (C-TAD) (gambar 2.6).^{43,44}



Gambar 2.6 Struktur gen HIF-1 α .

Regulasi protein HIF-1 α oleh *prolyl hydroxylase* pada keadaan normoksia. Pada keadaan hipoksia, HIF-1 α stabil dan bertanslokasi menuju nukleus, heterodimerisasi dengan HIF-1 β dan berikatan dengan *Hypoxia Response Element* (HRE) di daerah pengatur gen target (modifikasi dari⁴⁴)

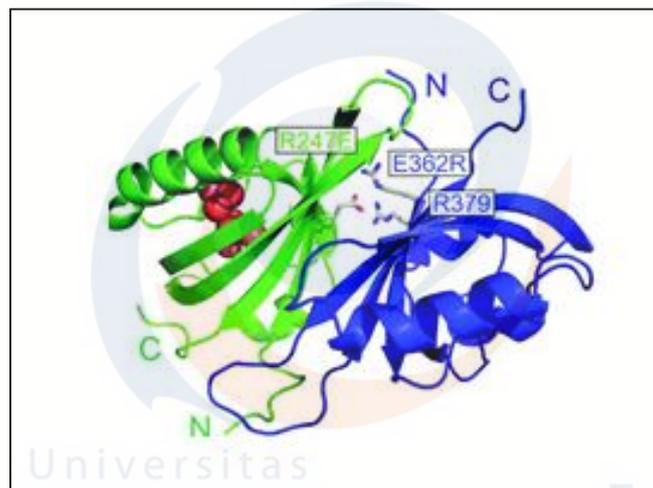
Protein HIF-1 α mampu meregulasi beberapa gen target di dalam nukleus pada keadaan hipoksia. Beberapa gen yang akan diregulasi ekspresinya oleh HIF-1 α disajikan dalam Tabel 2.1. Gen yang memiliki peran dalam proses regenerasi adalah kelompok gen yang berperan dengan proses angiogenesis, proliferasi sel, eritropoetin, dan metabolisme glukosa.³⁸

Tabel 2.1 Kelompok gen target yang diregulasi oleh HIF 1 α (modifikasi dari³⁸)

Fungsi	Gen
Proliferasi sel	Cyclin G2, KGF 2, WAF 1, TGF α
Ketahanan sel	ADM, EPO, IGF
Apoptosis	NIX, NIP3
Pembentukan struktur sitoskeleton	KRT14, KRT 18
Energi metabolisme	LEP
Adhesi sel	MIC2
Angiogenesis	VEGF, NEG
Metabolisme glukosa	HK, GLUT, GADPH,
Asam amino metabolisme	Transglutaminase
Regulasi pH	Carbonic anhydrase
Regulasi aktivitas HIF 1	P 35 srj
Motilitas sel	ANF/GPI1, c-MET, LRPI, TGF α

2.2.2 *Hypoxia inducible factor 2- alpha (HIF-2 α)*

Protein HIF-2 α disebut juga protein *endothelial Part Arnt Sim domain protein 1 (EPAS1)/HIF-1 α Like Faktor (HLF) / Member of PAS 2 (MOP2)*. Pada gambar 2.7, tampak struktur protein HIF-2 α yang terdiri atas PAS dan ARNT. Secara struktural, HIF-2 α dan HIF-1 α memiliki kemiripan, 48% asam amino keduanya identik, 83% terdapat dalam domain *basic Helix Loop Helix (bHLH)* dan sekitar 70% homolog dalam PAS. Hasil penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa secara fungsional HIF-2 α juga mengikat ARNT dan transaktivasi promotor *Hypoxia Response Element (HRE)* pada gen Epo (*erythropoetin*), gen VEGF, dan gen tirosin hidroksilase.⁴⁵



Gambar 2.7 Struktur protein HIF-2 α
(modifikasi dari⁴⁵)

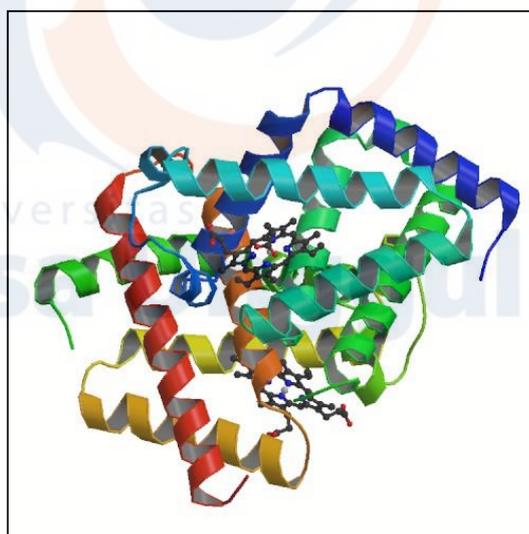
Selain ditemukan dalam sel endotel, protein HIF-2 α juga terdeteksi dalam fibroblas ginjal, hepatosit hati, lumen sel epidermis usus, sel interstitial pankreas, dan miosit jantung. Penelitian dengan *knock out* HIF-2 α pada embrio tikus, mengakibatkan embrio tikus letal, pematangan paru abnormal, dan cacat pembuluh darah. Hasil analisis sel karsinoma ginjal, menunjukkan bahwa HIF-2 α mampu merangsang sejumlah gen yang fungsinya beragam, hal ini menunjukkan bahwa HIF-2 α bekerja tidak terbatas hanya pada sel endotel pembuluh darah, tetapi juga pada sel lainnya.⁴⁵

HIF-2 α bersifat lebih stabil dibandingkan dengan HIF-1 α pada kadar O₂ yang lebih tinggi, namun pada keadaan normoksia protein HIF-2 α ini tidak ditemukan. Akumulasi HIF-2 α sebagian besar karena regulasi pasca-translasi, karena pada keadaan

hipoksia kadar rendah mRNA tidak diinduksi secara signifikan. Menariknya, kadar mRNA HIF-2 α tinggi dalam jaringan yang berperan pada proses transportasi O₂ sistemik, misalnya paru-paru, jantung, dan endotelium.⁴⁵ Delesi gen HIF-2 α menyebabkan anemia terkait dengan penurunan tingkat Epo. Sintesis Epo pada sel astrosit dalam sistem saraf pusat juga tampaknya diatur oleh HIF-2 α dan sangat penting untuk kelangsungan hidup neuron selama periode iskemia.⁴⁶

2.2.3 Sitoglobin (Cytoglobin/ Cygb)

Protein Cygb merupakan salah satu hemoglobin ekstra eritrositer selain mioglobin (Mb) dan neuroglobin (Ngb), serta merupakan anggota famili protein globin heksakoordinat. Cygb memiliki kemampuan mengikat oksigen dengan kuat. Protein ini ditemukan oleh Burmester dan Hankeln awal abad 21, bersamaan dengan Ngb yang diduga memiliki fungsi yang sama dengan Mb. Protein Cygb memiliki struktur khas terdiri atas delapan α -heliks (Gambar 2.8) dan memiliki residu globin yang bersifat lestari pada spesies mamalia, ikan, amfibi, reptil, dan burung.⁴⁷



Gambar 2.8 Struktur protein Cygb manusia.

Terdapat 8 alfa heliks dan beberapa residu pada N terminal dan C terminal (Modifikasi dari⁴⁷)

Tingginya afinitas Cygb terhadap oksigen menimbulkan dugaan bahwa Cygb berperan sebagai faktor difusi oksigen ke dalam mitokondria, yang fungsinya sama dengan mioglobin dalam sel otot untuk mempertahankan proses fosforilasi oksidatif.⁴⁷ Hipotesis yang menarik adalah ekspresi Cygb sebagian besar terjadi pada sel-sel derivat

fibroblas. Cygb pertama kali diidentifikasi pada tahun 2001 pada sel stelata hati yang diisolasi dari jaringan hati tikus. Protein Cygb yang ditemukan awalnya bernama *stellate cell associated activated protein* (STAP).⁴⁸ Penelitian dengan menggunakan hewan transgenik, ternyata Cygb berperan dalam respon pembentukan serat fibrotik pada beberapa organ termasuk hati dan ginjal. Oleh karena itu, diduga bahwa Cygb terlibat dalam respon adaptif yang terkait cedera, hal tersebut menunjukkan bahwa ekspresi Cygb diregulasi dalam keadaan hipoksia.^{49,50}

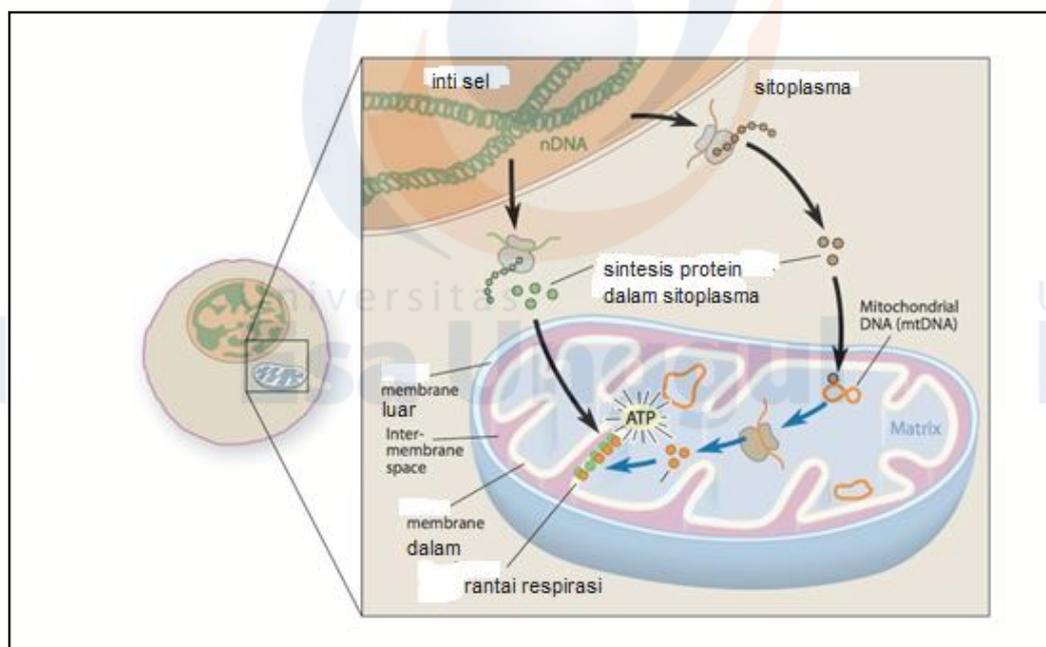
Kondisi hipoksia dapat menstimulasi Cygb yang diduga berperan membawa oksigen ke dalam mitokondria. Hasil penelitian Jusman dengan menggunakan hati tikus dalam keadaan hipoksia normobarik sistemik kronik menunjukkan bahwa keadaan hipoksia dapat menstimulasi sintesis protein Cygb.⁵¹ Hasil penelitian Singh, membuktikan adanya peran Cygb pada regenerasi otot skeletal. Pertama, bahwa Cygb terdapat pada inti sel basal lamina selama proses regenerasi otot skeletal. Kedua, menunjukkan bahwa Cygb melindungi myoblas dari apoptosis sel yang dimediasi oleh ROS. Ketiga, sel basal lamina yang kekurangan Cygb akan mengalami gangguan pada proses proliferasi dan diferensiasi sel.³⁰

Pengetahuan tentang peranan protein Cygb terhadap regenerasi jaringan masih sangat terbatas.⁴⁹ Beberapa hasil penelitian, menyimpulkan dugaan beberapa peranan Cygb dalam jaringan pada keadaan hipoksia, antara lain berperan dalam difusi oksigen ke dalam rantai pernafasan mitokondria dan sebagai penyimpan oksigen sesuai hasil penelitian Nakatani yang menunjukkan adanya Cygb pada fibrosis jaringan ketika persediaan oksigen berkurang.⁵² Fungsi lainnya adalah sebagai sensor oksigen, Cygb dapat meregulasi aktivitas protein yang mampu merespon perubahan kadar oksigen dalam jaringan. Cygb juga diduga terlibat dalam sintesis protein matriks ekstraseluler, seperti kolagen, terbukti dengan ditemukannya Cygb pada sejumlah sel fibroblas, kondroblas, dan osteoblas. Cygb berkontribusi pada sinyaling sel lipid sehingga meningkatkan ekspresi antioksidan serta berperan sebagai pelindung dari stres oksidatif seperti enzim hidrogen peroksidase.⁵³

2.2.4 Mitokondria

Mitokondria merupakan organel sel yang berperan sebagai sumber energi dalam sel karena dapat menyediakan energi dalam bentuk senyawa Adenosin Tri Fosfat (ATP). Mitokondria juga merupakan organel sel yang dapat membuat homeostatis Ca^{2+} yang berhubungan dengan ketahanan sel.⁵⁴

Struktur organela mitokondria dapat dilihat pada gambar 2.9. Mitokondria mirip kantung yang dilapisi dua membran, yaitu membran luar dan membran dalam, serta dua kompartemen yaitu matriks mitokondria dan ruang antar membran. Membran luar bersifat permeabel terhadap sebagian besar senyawa metabolit, sedangkan membran dalam bersifat selektif permeabel dan membungkus matriks di dalamnya. Membran luar ditandai dengan adanya berbagai enzim antara lain, asetil ko-enzim A sintetase dan gliserolfosfat asiltransferase. Adenil kinase dan kreatin kinase ditemukan di ruang antar membran. Fosfolipid kardiolipin terkonsentrasi di membran dalam bersama dengan enzim rantai pernafasan, ATP sintase, dan berbagai transporter membran^{54,55}



Gambar 2.9 Struktur mitokondria dan letak mitokondria dalam sel. Struktur mitokondria terdiri atas membran luar dan membran dalam yang mengalami pelipatan membentuk krista, bagian dalam mitokondria berupa matriks mitokondria (modifikasi dari⁵⁴)

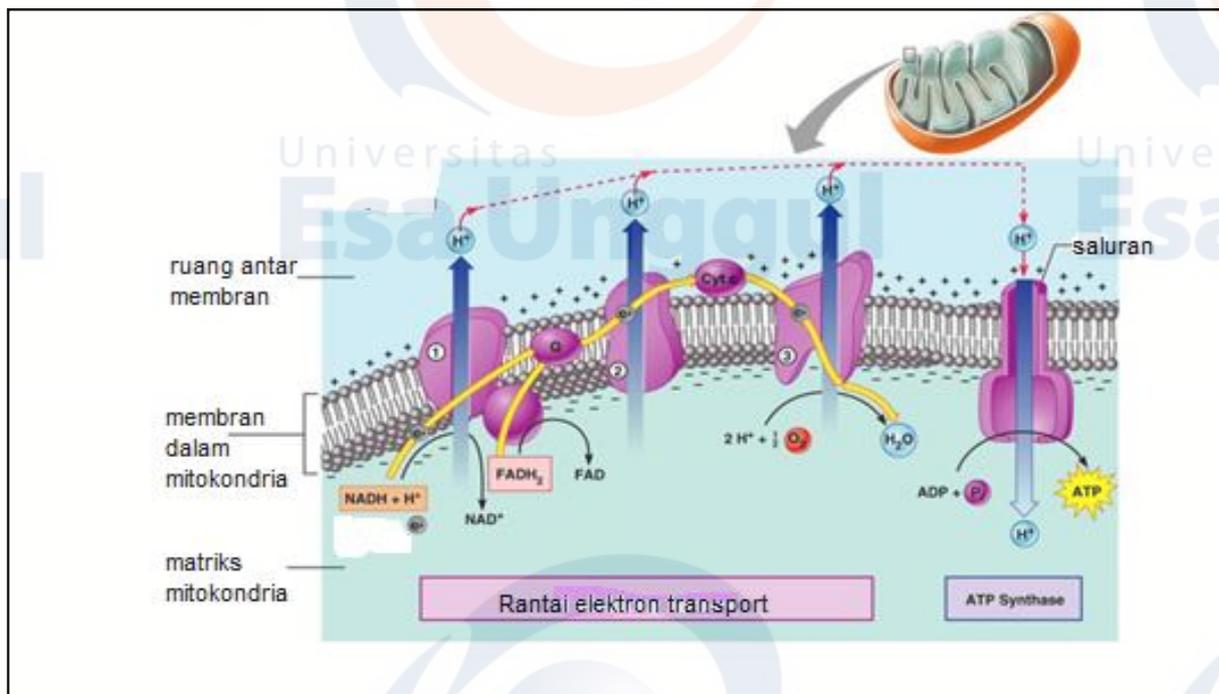
Pada membran dalam terdapat protein yang disebut porin yang memiliki struktur seperti lubang, serta enzim-enzim yang berperan dalam biosintesis lipid dan metabolisme mitokondria. Porin berbentuk saluran berukuran relatif besar pada dua lapisan membran

luar yang memungkinkan masuknya ion atau molekul berukuran <5 kDa. Ion atau molekul tersebut bebas memasuki ruang antar membran namun sebagian besar tidak dapat melewati membran dalam yang bersifat selektif permeabel.^{20,54}

Membran dalam memiliki struktur melipat ke bagian matriks mitokondria disebut sebagai krista. Struktur lipatan ini sangat membantu dalam meningkatkan luas permukaan membran dalam sehingga meningkatkan jumlah molekul ATP. Membran dalam mitokondria berperan dalam proses utama respirasi sel yaitu pembentukan energi. Matriks mitokondria, berperan dalam proses oksidasi asam lemak dan siklus Krebs. Matriks mitokondria mengandung protein sekitar 67% dari seluruh protein mitokondria, enzim, DNA mitokondria, dan ribosom.^{55,56}

Mitokondria berperan sebagai mesin transport elektron yang diatur oleh membran bagian dalam mitokondria. Rantai transpor elektron melibatkan perpindahan elektron dari senyawa nikotin amida adenin dinukleotida dedihidrogenase (NADH) dan suksinat. Kedua senyawa tersebut akan melepaskan elektron saat transduksi energi ke molekul oksigen sebagai aseptor elektron dan membentuk H_2O_2 .⁵⁷

Pada gambar 2.10 tampak rantai transpor elektron yang terdiri atas lima kompleks enzim yang berperan menghasilkan ATP, yaitu kompleks I enzim NADH- Q oksido reduktase, kompleks II enzim suksinat ubikuinon oksido reduktase, kompleks III enzim ubikuinon ferrositokrom *c* oksidoreduktase, kompleks IV enzim ferrositokrom *c* oksidase, dan kompleks V enzim ATP sintase. Elektron dari kompleks I dan II berasal dari reaksi oksidasi NADH oleh kompleks I dan oksidasi suksinat oleh kompleks II, ditransfer ke ubikuinon (koenzim Q, CoQ). Elektron dari ubikuinon ditransfer lagi ke kompleks III dan tereduksi. Elektron dari kompleks III ditransfer ke sitokrom *c* (Cyt C) dan dioksidasi di kompleks IV. Elektron yang dihasilkan kompleks IV digunakan untuk mengubah O_2 menjadi H_2O . Transfer elektron antara kompleks I, III, dan IV disertai transpor proton dari matriks ke ruang antar membran menggunakan energi bebas yang dilepaskan oleh masing-masing kompleks. Pemindahan proton ini mengakibatkan akumulasi proton pada ruang antar membran sehingga terjadi gradien potensial proton. Keadaan ini dimanfaatkan oleh kompleks V untuk mensintesis ATP dari adenosine difosfat (ADP) dan fosfat inorganik (Pi) dengan menggunakan energi yang dilepaskan saat proton berpindah dari ruang antar membran ke matriks, sehingga terbentuklah molekul ATP yang banyak diperlukan dalam berbagai proses termasuk proses regenerasi jaringan.^{55,56,57}



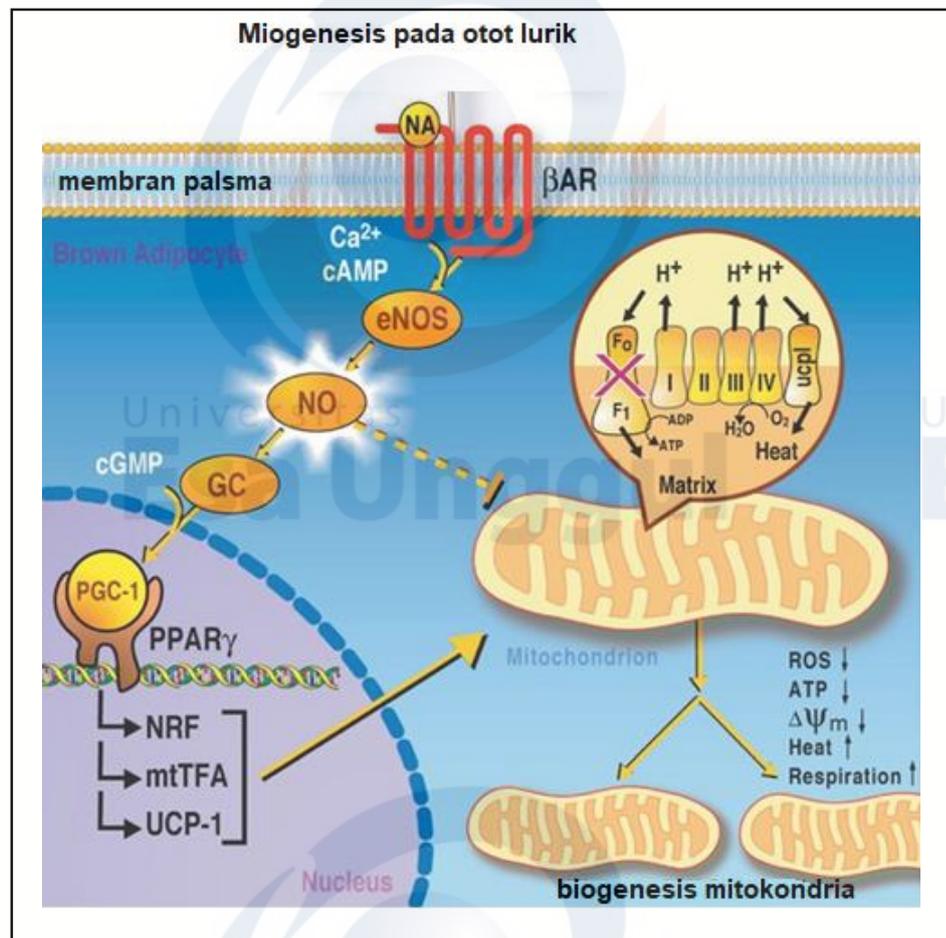
Gambar 2.10 Transport elektron pada mitokondria. Perpindahan elektron dari kompleks I dan II ke kompleks III dan IV sehingga dihasilkan ATP (modifikasi dari⁵⁷)

Mitokondria sebagai organel penghasil energi, memiliki peran dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel serta jaringan. Jika kebutuhan akan energi cukup tinggi, maka terjadi proses biogenesis mitokondria untuk memenuhi kebutuhan tersebut. Biogenesis mitokondria dapat didefinisikan sebagai sintesis dan pertumbuhan mitokondria dalam hal jumlah, masa, serta ukuran. Protein mitokondria dikode oleh genom inti sel dan genom mitokondria itu sendiri. Biogenesis mitokondria memerlukan sekitar 1000–1500 protein yang dikode oleh genom inti sel. Biogenesis mitokondria terjadi karena adanya tekanan dari lingkungan seperti aktivitas tubuh yang tinggi, perubahan suhu, stres oksidatif, pembelahan sel, serta diferensiasi sel. Biogenesis mitokondria juga memerlukan membran mitokondria yang utuh untuk mendukung sintesis protein dan mempertahankan gradien proton selama respirasi.^{55,58}

Mitokondria mampu mengatur regulasi biosintesis pada proses miogenesis. Hasil penelitian Duguez memperlihatkan kemampuan regenerasi otot rangka tikus tergantung pada kemampuan fosforilasi oksidatif di mitokondria. Sel pada jaringan ikat dan sel otot dapat memodulasi ekspresi gen *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

coactivator (PGC-1 α), yang berperan dalam proses biogenesis mitokondria selama regenerasi otot skeletal.¹⁷

Peristiwa biogenesis mitokondria terjadi melalui modulasi cAMP dan kalsium yang akan menstimulasi gen inti sel yaitu gen PGC-1 α serta aktivitas transkripsi *Nuclear respiratory factor* (Nrf-1) dan *mitochondria transcription factor A* (mtTFA). Protein Nrf-1 dan mtTFA berperan mengatur biogenesis mitokondria. Protein Nrf1 berfungsi sebagai faktor transkripsi yang mengaktifkan ekspresi beberapa gen metabolisme utama yang mengatur pertumbuhan sel dan gen inti yang diperlukan untuk respirasi mitokondria, transkripsi, dan replikasi DNA mitokondria. Protein mtTFA berperan mengatur transkripsi DNA mitokondria, sehingga mengaktifkan protein mitokondria (Gambar 2.11).^{59,60}



Gambar 2.11 Proses Biogenesis mitokondria. Biogenesis mitokondria terjadi melalui modulasi cAMP dan Ca^{2+} dan ekspresi gen inti sel (modifikasi dari⁵⁸)

2.2.5 Superoksida dimustase (SOD)

Mitokondria merupakan organel penghasil *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat menyebabkan kerusakan mitokondria dan berdampak secara fisiologi terhadap sel. Laporan tentang adanya ROS yang diproduksi oleh rantai pernapasan pada mitokondria, pertama kali dilaporkan pada tahun 1966. Hasil penelitian dengan isolasi mitokondria menunjukkan bahwa mitokondria menghasilkan H_2O_2 .²⁰

ROS adalah molekul yang berasal dari oksigen (O_2) intraseluler yang dapat mengoksidasi molekul lain. ROS berasal dari superoksida (O_2^-) hasil reduksi O_2 di membran dalam mitokondria dan bersifat reaktif terhadap lipid, protein, dan DNA. ROS terdiri atas anion superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), serta radikal hidroksil (OH^\cdot). Setiap ROS memiliki sifat kimia yang berbeda serta mampu memicu berbagai reaksi biologis.²⁰

Anion superoksida merupakan radikal bebas turunan oksigen yang berasal dari reduksi molekul oksigen dari kompleks I (NADH dehidrogenase) dan kompleks III (ubiquinol: sitokrom c oksido reduktase) pada rantai respirasi. Kompleks III Qo dan gliserol 3-fosfat dehidrogenase pada membran dalam mitokondria merupakan penghasil O_2^- . Superoksida diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh superoksida dismutase (SOD). SOD adalah kelompok enzim yang mengkatalisis superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan oksidator kuat, melalui reaksi reduksi dan oksidasi dapat membentuk radikal hidroksil yang dapat membahayakan sel. Pada mamalia dan sebagian besar kordata, terdapat tiga bentuk superoksida dismutase, yaitu SOD_1 terletak terutama di sitoplasma, SOD_2 di mitokondria, dan SOD_3 terletak di ekstraseluler. SOD_1 berbentuk dimer (terdiri dari dua unit), sementara SOD_2 dan SOD_3 adalah tetramers (4 subunit). SOD_1 mengandung ion tembaga, SOD_3 mengandung seng, dan SOD_2 memiliki ion mangan di pusat reaktifnya, maka disebut enzim MnSOD.^{20,61}

Kejadian hipoksia relatif juga menyebabkan peningkatan kadar ROS dan senyawa radikal bebas di mitokondria, akibat tingginya metabolisme aerob. Para peneliti mulai mengalihkan perhatiannya terhadap fenomena *ROS-dependent* dalam regulasi aktivitas protein HIF-1 α . Sampai saat ini belum ada kesepakatan para ahli tentang mekanisme utama regulasi HIF-1 α dan ROS. Senyawa ROS yang dihasilkan diduga berperan aktif

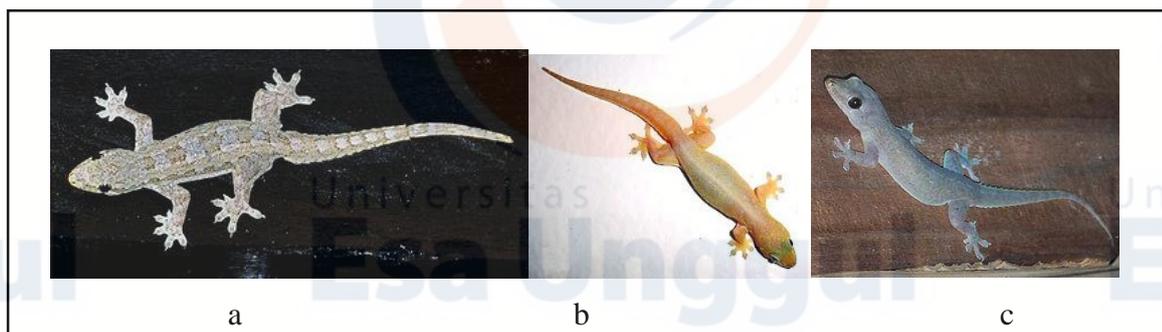
dalam stimulasi regenerasi jaringan, namun ekspresi berlebihan senyawa ROS akan menghambat proses regenerasi jaringan.^{25,62}

2.3 Cecak Rumah (*Hemidactylus platyurus*)

2.3.1 Jenis-jenis cecak

Cecak adalah hewan reptil yang biasa merayap di dinding atau pohon. Berdasarkan habitatnya terdapat dua jenis, yaitu cecak rumah dan cecak hutan. Cecak rumah (gambar 2.6) memiliki tiga spesies yang berbeda yaitu *Hemidactylus frenatus*, *Hemidactylus platyurus* (cecak tembok) dan *Gehyra mutilate*, dengan habitat berupa bangunan, semak, dan pohon. Cecak tembok (*Hemidactylus platyurus*) adalah sejenis reptil yang termasuk suku cecak (Geckonidae). Dalam bahasa Inggris disebut *flat-tailed house gecko*, seperti tercermin dari nama ilmiahnya, *platyura* (dari bahasa Yunani, *platus* artinya pipih, *ura* artinya ekor).⁶³

Pada Gambar 2.12 tampak *Hemidactylus platyurus* ini bertubuh pipih lebar, berekor lebar dengan jumbai-jumbai halus di tepinya. Pada sisi bawah bagian tubuhnya terlihat adanya lipatan kulit agak lebar di sisi perut dan di belakang kaki. Cecak kayu (*Hemidactylus frenatus*) memiliki tubuh lebih kurus, bentuk ekor lebih bulat, dan memiliki tonjolan kulit serupa duri. Cecak kayu lebih menyukai tinggal di pohon atau di bagian rumah yang berkayu seperti atap rumah. Terkadang didapati bersama cecak tembok di dinding luar rumah dekat lampu, namun umumnya kalah bersaing dalam memperoleh makanan. Spesies cecak gula (*Gehyra mutilata*), bertubuh lebih kecil, dengan kepala membulat dan warna kulit lebih cerah. Cecak ini kerap ditemui di sekitar dapur, kamar mandi, dan lemari makan, mencari butir-butir nasi atau gula.^{63,64}



Gambar 2.12 Jenis-jenis cecak (a) cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*); (b) Cecak kayu (*Hemidactylus frenatus*); (c) cecak gula (*Gehyra mutilata*) (modifikasi dari⁶⁴)

2.3.2 Taksonomi Dan Penyebaran Cecak Rumah

Cecak rumah termasuk ke dalam kelas Reptilia, ordo Squamata, dan famili Gekkonidae. Cecak *H. frenatus* ditemukan di seluruh wilayah Indonesia, sedangkan *H. platyurus* ditemukan di pulau Jawa, Nias, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Lombok, dan Flores. *H. platyurus* tersebar luas, mulai dari Nepal dan Bhutan, India utara (Darjeeling, Sikkim), India timur, termasuk Andaman dan Nikobar, Sri Lanka, lewat Myanmar, Vietnam, Thailand, semenanjung Malaya sampai ke Sumatra, Borneo, dan Jawa, ke timur sampai Filipina, Tiongkok, dan Florida, Amerika Serikat.⁶⁵

Tabel 2.2 Tabel Klasifikasi Ilmiah Cecak Rumah (modifikasi dari^{63,66})

Taksa	Nama taksa
Kingdom	Animalia Linnaeus, 1758 - kerajaan hewan (animals)
Phylum	Chordata Bateson, 1885 – filum chordata (chordates)
Class	Reptilia Laurenti, 1768 – kelas binatang melata (reptiles)
Order	Squamata Opperl, 1811 - ordo kadal dan ular
Family	Gekkonidae Gray, 1825 - suku cecak (geckoes)
Genus	<i>Hemidactylus</i> Gray, 1825
Species	<i>H. platyurus</i>
Binomial nama latin	<i>Hemidactylus platyurus</i> (Schneider, 1797)

2.3.3 Anatomi, morfologi dan Adaptasi cecak

Cecak rumah berukuran sedang dengan panjang total hingga 13 cm dan separuh tubuhnya adalah ekor. Bentuk badan cecak rumah pipih ke arah lateral, terdiri atas kepala, badan dan ekor. Moncong cecak lebih panjang dari jarak antara mata, dahi berbentuk cekung, dengan lubang telinga kecil berbentuk oval. Terdapat ekspansi kulit dari ketiak ke selangkangan serta sepanjang sisi tubuh, di tepi belakang tangan dan kaki. Posisi ekor ke bawah mendatar memipih lebar serta runcing di ujung, dan terdapat sisik tajam di tepi lateral. Terdapat dua pasang tungkai dengan digit pada empat kaki melebar dan setengahnya berselaput.⁶⁷

Cecak pada umumnya berwarna abu-abu, tetapi ada pula yang berwarna coklat kehitam-hitaman. Pada sisi dorsal tampak adanya bintil-bintil sisik yang membesar, berwarna abu-abu keputihan dengan pola gelap serupa batik atau bunga kehitaman simetris di atas punggungnya. Sebuah garis kehitaman tipis tampak dari depan mata, melewati timpanum, bahu, sisi perut hingga ke pinggul. Pada sisi ventral tampak warna keputihan atau kuning.⁶⁸

Secara struktur, ekor cecak disokong oleh ruas-ruas tulang ekor (vertebra kaudalis) yang tersusun berurutan dari pangkal sampai ke ujung ekor. Pada ekor terdapat jaringan lemak, jaringan otot, jaringan saraf (pusat dan tepi), pembuluh darah, dan kulit. Pada bagian tengah setiap ruas tulang ekor cecak terdapat bagian yang menyempit membentuk suatu celah melintang disebut tataran autotomi. Berbeda dengan cecak, bunglon tidak dapat melakukan autotomi ekor karena ekor bunglon disokong oleh susunan ruas tulang ekor, yang masing-masing ruasnya tidak memiliki tataran autotomi.⁶⁸

Tidak semua ruas tulang ekor cecak memiliki tataran autotomi. Umumnya, ruas tulang ekor pertama sampai ke lima tidak memiliki tataran autotomi, karena pada bagian tersebut terletak sepasang alat kelamin jantan yang disebut hemipenis. Oleh karena itu autotomi ekor tidak mungkin terjadi pada ruas tulang ekor tersebut.⁶⁶

Organ reproduksi cecak jantan berupa testis yang berbentuk oval dan sepasang hemipenis. Testis terletak di dorsal rongga abdomen yang digantung oleh mesorkium. Hemipenis merupakan sepasang alat kopulasi berupa tonjolan di dinding kloaka, jika tidak sedang kopulasi akan melipat masuk ke dalam pangkal kauda dengan dinding ototnya di bagian luar, kemudian jika akan mengadakan kopulasi ditonjolkan keluar. Saat cecak mengadakan kopulasi, hanya satu hemipenis saja yang dimasukkan ke dalam

saluran kelamin cecak betina. Pada cecak betina, organ genitalianya berupa ovarium yang berjumlah sepasang, berbentuk oval, terletak di bagian ventral kolumna vertebralis. Saluran reproduksi oviduk panjang dan bermuara di kloaka. Cecak betina menghasilkan ovum di dalam ovarium. Ovum kemudian bergerak di sepanjang oviduk menuju kloaka dan difertilisasi oleh sperma dari cecak jantan.^{66,68}

2.3.4 Adaptasi Tingkah Laku

Pada umumnya cecak hidup di tempat gelap, seperti dalam lubang dan celah-celah batu. Cecak melakukan aktivitasnya pada waktu senja sampai malam hari dan aktivitasnya berkurang pada kondisi terang. Cecak memakan mangsa yang ada di sekitarnya dengan melakukan pergerakan kemudian menangkap mangsa yang melewatinya. Cecak menangkap mangsanya dengan menggunakan lidah, yang akan ditelan secara utuh (raptorial). Beberapa spesies cecak memakan serangga, laba-laba, buah-buahan, madu, bangkai, dan menjilat cairan tertentu.^{64,69}

Cecak terkenal sebagai pemanjat yang ulung. Binatang ini mampu memanjat dinding tegak lurus, bahkan memanjat dan merayap di atap. Kemampuan ini dimiliki karena cecak memiliki bulu-bulu halus yang mampu melekat pada permukaan apapun pada keempat kakinya. Ekor cecak berfungsi sebagai penyeimbang pada saat cecak memanjat permukaan yang tegak lurus. Adapun, adaptasi tingkah laku reproduksi cecak adalah bereproduksi dengan cara bertelur (ovipar) dan fertilisasi cecak terjadi secara internal.⁶⁴

Cecak memiliki daya regenerasi tinggi pada ekor yang terputus (autotomi) dan mampu membentuk ekor baru. Autotomi adalah perilaku cecak dalam kemampuannya memutuskan ekor untuk mengelabui predator. Saat autotomi, cecak akan menekan ototnya di bagian tataran autotomi sehingga ekor terputus (gambar 2.13). Ekor baru yang terbentuk memiliki morfologi yang berbeda dengan ekor lama. Perbedaan ekor lama dan ekor regenerat terletak pada warna kulit, bentuk sisik, struktur saraf, dan struktur tulang ekor. Ekor regenerat memiliki ukuran panjang sedikit lebih pendek dibandingkan ekor semula.³³



Gambar 2.13 Proses autotomi pada bagian pangkal ekor cecak rumah (modifikasi dari⁶⁴)

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Strategi Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan studi eksperimental deskriptif dengan desain studi kohort pada regenerasi jaringan ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) yang mengalami autotomi, dan selanjutnya dilakukan analisis:

1. Gambaran histologi pertumbuhan jaringan baru ekor cecak pada pertumbuhan 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30 hari pasca automi dengan pewarnaan Hemaktosilin-Eosin.
2. Ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD pada pertumbuhan jaringan ekor cecak 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30 hari pasca autotomi.
3. Ekspresi protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb dengan Western Blot dan imunohistokimia pada pertumbuhan jaringan ekor cecak 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30 hari pasca autotomi.

3.2. Bahan Penelitian

3.2.1 Sampel

Sampel penelitian adalah jaringan ekor hasil regenerasi jaringan ekor cecak rumah yang telah dipelihara dan beradaptasi di kandang Laboratorium Herpetologi Zoologi Puslitbang Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) - Cibinong. Cecak yang dipilih adalah cecak betina dewasa spesies *Hemidactylus platyurus* yang belum mengalami autotomi dalam keadaan hidup dengan berat rata-rata 5 gram dan panjang tubuh 10-13 cm. Cecak ditangkap dan diletakkan dalam plastik yang berlubang. Ijin etik penelitian diperoleh dari Komite Etik Penelitian FKUI dengan no. 672/UN2.F1/ETIK/VII/2015.



Gambar 3.1. Cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*)
(Modifikasi dari⁶⁴)

Cecak rumah (*H. platyurus*) yang ditangkap (gambar 3.1) memiliki ciri-ciri adanya motif seperti batik berwarna gelap pada punggungnya, terdapat gelambir di sepanjang ventral tubuhnya, dengan bentuk ekor lebih pipih dibandingkan jenis cecak lainnya. Pada sepanjang tepi dorsal tubuh terdapat gelambir kulit dan seperti pada cecak lainnya terdapat selaput pada jari kakinya. Cecak jenis ini lebih mudah ditemui di lingkungan rumah, biasanya pada tembok rumah.

Cecak dipelihara selama 3-7 hari untuk beradaptasi di dalam kandang. Kandang terbuat dari kaca dengan dialasi daun kering (Gambar 3.2). Di dalam kandang diberi kayu yang berdiri melintang untuk membantu cecak bergerak ke berbagai arah. Lubang pada bagian depan kandang yang terbuka ditutupi kain kasa yang telah dipotong melintang bagian tengahnya serta dililiti kawat pada tepi kain yang terpotong. Sehingga kain mudah dibuka dan ditutup untuk memasukan dan mengeluarkan cecak serta memberi makan cecak. Cecak dipelihara dalam kandang dengan penyinaran dari cahaya matahari yang masuk ke dalam ruangan, 12 jam terang dan 12 jam gelap. Makanan cecak berupa serangga kecil yang masih hidup dan bergerak aktif seperti nyamuk, lipas, dan belalang. Setiap hari diberi minum dalam mangkok kecil yang disimpan di tengah kandang.



Gambar 3.2 Kandang cecak

berukuran 40 x 20 x 30 cm³ dari bahan kaca yang ditutupi kain kasa yang dipotong melintang dan dililiti kawat agar mudah dibuka dan ditutup

Jumlah sampel cecak yang digunakan adalah sebanyak 30 ekor, berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

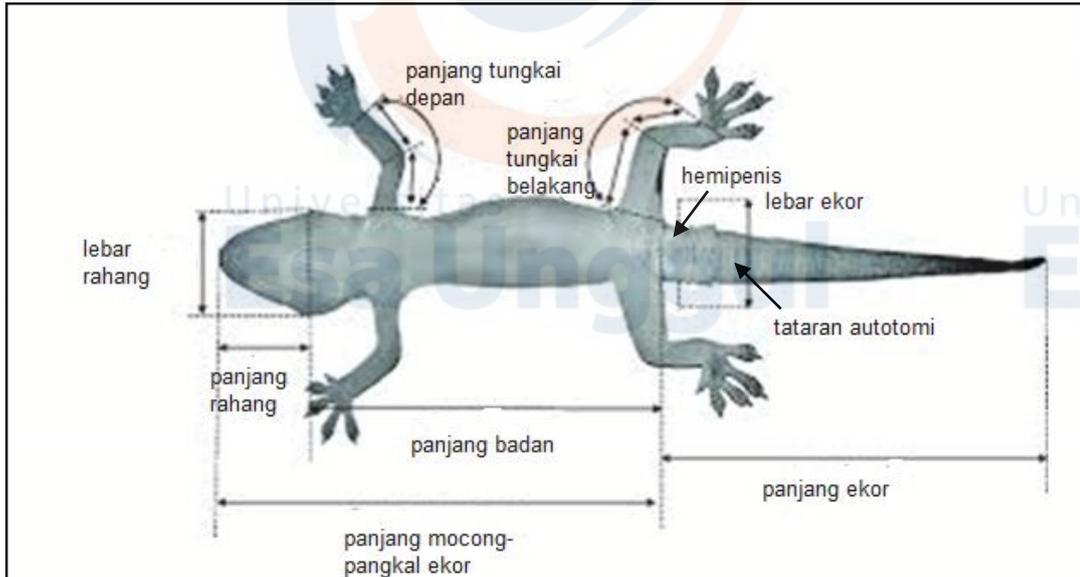
Keterangan:

t = jumlah perlakuan (autotomi)

r = jumlah ulangan perkelompok

Dalam penelitian ini digunakan 10 kelompok perlakuan, maka perhitungannya adalah : $(10 - 1)(r - 1) \geq 15$, maka r = minimal 3 ekor untuk setiap kelompok perlakuan. Sehingga jumlah seluruh sampel penelitian 30 ekor cecak dewasa yang belum mengalami autotomi dan digunakan 3 ekor cecak yang tidak mengalami regenerasi sebagai kontrol negatif.

Semua cecak dalam kandang diautotomi, dengan cara mencengkeram bagian badannya dan ujung ekor dipegang sambil digoyang-goyang perlahan, maka dengan mudah cecak akan melepaskan ekornya. Cecak akan merasa terancam sehingga akan menekan ekornya sampai terputus pada tataran autotomi yang terletak pada ruas ekor ke 6-8 dari pangkal ekor (Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Anatomi tubuh cecak (*H. platyurus*)
(modifikasi dari⁶⁵)

Cecak dikembalikan ke dalam kandang dan dibiarkan beregenerasi sampai hari ke 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30. Pada pengamatan hari-hari tersebut, ekor cecak mulai tumbuh, dan diambil untuk dianalisis. Jaringan ekor yang telah beregenerasi dipotong dengan menggunakan pisau bedah ukuran 11 pada tataran autotomi kurang lebih 0,5 cm dari hemipenis ke arah kaudal, sehingga diharapkan cecak dapat beregenerasi dan kembali dan melakukan reproduksi (Gambar 3.4 A).

Jaringan hasil regenerasi ekor dipisahkan, dua bagian sampel disimpan dalam suhu -80°C untuk analisis mRNA dan protein dengan uji qRT-PCR. Sampel lainnya disimpan dalam larutan formaldehid 10% untuk dibuat sediaan dengan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) serta pemeriksaan imunohistokimia (IHK). Pengambilan sampel dilakukan pada area sepanjang 0,3-0,4 cm dari pangkal ekor hasil regenerasi (Gambar 3.4 B). Menurut Alibardi, jaringan di bagian atas luka akan mengalami disintegrasi jaringan,⁶ sehingga area di atas luka ini sangat penting untuk pengamatan histologi dan analisis molekuler.



Gambar 3.4 Cecak yang telah mengalami regenerasi pada ekornya
 (A) Pemotongan ekor hasil regenerasi yang dipotong 0,5 cm dari hemipenis
 (B) potongan ekor cecak hasil regenerasi jaringan untuk analisis sediaan

3.2.2 Bahan

- a. Analisis mRNA dengan teknik qRT-PCR primer untuk HIF-1 α ; HIF-2 α ; sitoglobin (Cygb); PGC-1 α ; MnSOD; serta gen referens (18S rRNA) menggunakan KAPA SYBR *FAST one step* RT qPCR (universal Kapa Biosystems, KK4650); Master Pure™ RNA Purification Kit (epicentre Illumina Company, Water-Biotechnology) *gradesterilized-nuclease protease and pyrogen free*, etanol, *TE Buffer*.
- b. Analisis histologi dengan pulasan HE: formalin 10%; alkohol 70%; alkohol 80%; alkohol 95%; dan alkohol 100%; xilol; blok parafin; hematoksilin-eosin; akuades.
- c. Analisis IHK: antibodi primer anti HIF-1 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-1 α , My BioSource MBS241603*); antibodi primer anti HIF-2 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-2 α NB 100-122*); antibodi primer antiCygb (*Rabbit polyclonal anti Cygb, LifeSpan BioScience LS-C312809*). antibodi sekunder dari tikus (Trekkie Universal Link dalam Starr Trek Universal HR Detection System) (BioCare Medical – STUHRP700 H).
- d. Analisis *Western Blot*: RIPA *Lysis Buffer*; akrilamid; bis-akrilamid; Tris HCl 1,5 M dan 0,5 M; larutan *sodium dodecyl sulfate* (SDS PAGE); amonium persulfat (APS); tetrametiletilendiamin (TEMED); dapar elektroda 10x; buffer transfer; *Phosphate Buffer Saline* (PBS) Tween; dapar asetat; dapar sampel; pewarna

Ponceau; reagen imunostar Biorad; antibodi primer anti HIF-1 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-1 α My BioSource MBS241603*); antibodi primer anti HIF-2 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-2 α NB 100-122*); antibodi primer anti Cygb (*Rabbit polyclonal anti Cygb LifeSpan BioScience LS-C312809*); antibodi sekunder Trekkie Universal Link dalam Starr Trek Universal HR Detection System (BioCare Medical – STUHRP700 H).

3.2.3 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah: (1) Untuk pewarnaan HE dan IHK: cawan celup; tempat pembekuan sediaan; mikrotom; penangas air; kaca objek; kaca penutup; mikroskop; (2). qRT-PCR: *Thermo Scientific Microplate Reader VarioScan Flash*; tabung mikro; pipet mikro; *quantitative real time RT-PCR* (Eco48 Illumina), MJ Mini opticon BIO RAD laboratories USA (3) *Western Blot*: *alat Western Blot, Transfer Blotting, shaker, Image Quant* (4) Mikroskop Confocal Zeiss.

3.3 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi, Puslitbang Biologi LIPI Cibinong; Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI); Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI; Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, sejak bulan Januari 2015 sampai dengan Februari 2018.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengukuran panjang ekor cecak

Ekor cecak hasil regenerasi yang telah tumbuh setelah proses autotomi, diukur dengan menggunakan jangka sorong digital dan penggaris, dengan skala sentimeter (cm). Cecak diletakkan diatas permukaan yang datar dan diukur dari pangkal ekor tumbuh sampai ujung ekor yang baru tumbuh. Agar cecak tetap diam, salah satu kakinya dipegang dan ditahan (Gambar 3.5). Data panjang ekor dicatat dengan satu angka di belakang desimal.



Gambar 3.5 Cara pengukuran panjang ekor hasil regenerasi

3.4.2 Isolasi RNA total jaringan ekor cecak

Isolasi RNA total jaringan ekor cecak dilakukan dengan menggunakan Master Pure™ RNA Purification Kit (*Epicentre Illumina Company*). Jaringan hasil regenerasi ekor cecak segar atau beku ditimbang, kemudian dilumatkan menggunakan pelumat mikro. Sampel dimasukkan ke dalam tabung mikro berukuran 1,5 mL. Proteinase K 1 μL dan *Tissue and Cell Lysis Solution* 300 μL ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit dan divortex setiap 5 menit. Selanjutnya larutan yang berisi sampel tersebut diinkubasi dalam es selama 3-5 menit. Selanjutnya larutan Master Pure Complete (MPC) untuk presipitasi protein ditambahkan sejumlah 175 μL ke dalam larutan yang telah diinkubasi dalam es. Larutan dikocok dengan vorteks selama 10 detik dan disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 g. Larutan supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro baru dan ditambahkan 500 μL isopropanol dan di balik-balikan sebanyak 30-40 kali. Larutan disentrifugasi kembali selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 g. Larutan supernatan selanjutnya dibuang dan endapan dicuci dengan 70% etanol sebanyak 2 kali, dan larutan dibuang dengan hati-hati agar endapan tidak terbang. Larutan TE bufer sejumlah 35 μL ditambahkan untuk melarutkan mRNA yang telah terlarut dan disimpan dalam lemari beku -80°C .

3.4.2.1 Penilaian Kemurnian mRNA

Penilaian kemurnian RNA dilakukan untuk mengetahui bahwa sampel tidak terkontaminasi protein dan untuk mengetahui jumlah RNA total hasil isolasi yang akan digunakan sebagai dasar perhitungan pada uji qRT-PCR. Pengukuran konsentrasi RNA dilakukan secara spektrofotometri. Hasil RNA total diencerkan 100 kali dengan cara menambahkan 495 μ L air bebas nuklease ke dalam 5 μ L RNA hasil isolasi. Larutan sampel diukur serapannya pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Kemurnian RNA dinilai melalui indeks kemurnian serapan asam nukleat terhadap protein (A_{260}/A_{280}) (RNA/protein). Indeks kemurnian RNA hasil isolasi dianggap baik bila rasio $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$. Pada uji qRT-PCR digunakan konsentrasi RNA 200 ng dalam 2 μ L dengan pengenceran 10 kali.

3.4.2.2 Desain primer

Pelacakan gen HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSO₄D dan 18S rRNA cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*), dimulai dengan pengkajian filogenetik spesies yang paling dekat kekerabatannya.⁵¹ Diperoleh spesies *Gecko japonicus* yang merupakan spesies yang terdekat kekerabatannya dengan *H. platyurus* dan telah teridentifikasi urutan DNANYA. Identifikasi basa DNA diperoleh dari website *National Center for Biotechnology Information* (NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Selanjutnya gen tersebut dianalisis dengan program BLAST. Penentuan daerah lestari ditentukan dengan menggunakan program Mega7. Urutan basa yang diperoleh disejajarkan dengan Program *ClustalX* untuk kemudian dipilih yang paling memiliki kemiripan dalam basa penyusunnya dengan kemiripan 80-100 % (lampiran 3; data penelitian), sebagai dasar pelacakan penempelan primer. Dilakukan analisis penentuan DNA primer dengan perangkat lunak *Primer3*, dan secara manual dipilih daerah yang paling lestari dengan mempertimbangkan daerah tersebut adalah daerah urutan sandi, dengan persyaratan umum, antara lain jumlah nukleotida, kandungan GC minimal, dan tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplementer antar basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya. Pada tabel 3.1, ditampilkan hasil analisis desain primer DNA untuk cecak rumah (*H. platyurus*).

Tabel 3.1. Primer 18S rRNA, HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*)

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Produk (pb)
18 S rRNA	ACA CGC TCC ACC TCA TCT TC	ATC CCA GAG AAG TTC CAG CA	188
HIF-1 α	CAG GGC GTG GTA GTA TTC GT	GAA CCT CCC ATG ACA TGC TT	207
HIF-2 α	TCC ATG TTA GGC AAA TGC AA	ATG AAC ACTGGC CAG GAA AC	248
Cygb	TCC TTG TAC GCA GCA GTC AC	CTC CTC TGT ACT GGC CTT GG	198
PGC-1 α	TCT CGA TCG GGA ATATGG AG	GAT CTG TCG CCT TCT TGC TC	159
MnSOD	CAC AGC AAG CTA AGC GTT TG	TTC TCA TCC TGG GGA CTT TG	206

Prosedur qRT-PCR adalah sebagai berikut: sintesis DNA selama 5 menit, suhu 42⁰C; inaktivasi *Reverse transcriptase* 2-5 menit, suhu 95⁰C; siklus PCR dilakukan 40 siklus selama 10 detik pada suhu 95⁰C; 30 detik pada suhu 57⁰C untuk gen HIF-1 α dan gen HIF-2 α ; suhu 55⁰C untuk gen Cygb, 18S rRNA, MnSOD, dan PGC -1 α ; 30 detik pada suhu 72⁰C. selanjutnya tahap *melting curve* selama satu menit pada suhu 95⁰C, satu menit pada suhu 55⁰C, 10 detik pada suhu 55⁰C.

Gen 18S rRNA digunakan sebagai gen referensi. Desain primer gen 18S rRNA dirancang dengan menggunakan metoda yang sama dengan desain gen lainnya. Sebagai kontrol negatif digunakan air bebas nuklease sebagai pengganti RNA untuk menyingkirkan hasil positif palsu. Dari hasil qRT-PCR diperoleh nilai efisiensi dan *Cycle Threshold* (CT). Analisis ekspresi gen dinilai secara relatif kuantitatif sehingga diperoleh nilai kadar relatif mRNA dengan menggunakan rumus Livak sebagai berikut :

$$\begin{aligned}\Delta C_t(\text{test}) &= C_t(\text{target, test}) - n C_t(\text{ref, test}) \\ \Delta C_t(\text{calibrator}) &= C_t(\text{target, calibrator}) - C_t(\text{ref, calibrator}) \\ \Delta \Delta C_t &= \Delta C_t(\text{test}) - \Delta C_t(\text{calibrator}) \\ 2^{-\Delta \Delta C_t} &= \text{normalized expression ratio}\end{aligned}$$

Keterangan :

Target = gen X (HIF1- α /HIF-2 α /Cygb/PGC-1 α /MnSOD)

Test = gen hasil regenerasi jaringan ekor cecak

Calibrator = gen jaringan ekor cecak bukan hasil regenerasi jaringan

Ref = 18S rRNA

Nilai ambang (*threshold*) diatur untuk memperoleh efisiensi ekspresi yang paling optimum dan diseragamkan agar semua data dapat dibandingkan. Nilai CT merupakan perpotongan kurva dengan garis ambang.

3.4.3 Teknik *Western Blot* (WB)⁷⁰

Teknik *Western Blot* ini digunakan sebagai informasi keberadaan protein secara akurat dengan melihat ukuran berat protein sehingga dapat mendukung data imunohistokimia (IHK) untuk menghindari kesalahan deteksi protein. Pada penelitian ini teknik WB digunakan untuk mendeteksi keberadaan protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb pada sampel jaringan hasil regenerasi jaringan ekor cecak. Sampel jaringan regenerasi ekor cecak dibuat menjadi homogenat.

Analisis WB dilakukan dalam 3 tahap untuk deteksi protein spesifik yaitu elektroforesis, elektrotransfer, dan deteksi dengan antibodi spesifik terhadap protein target. Pada tahap pertama, protein dipisahkan dengan poliakrilamid gel elektroforesis yang mengandung *sodium dodecyl sulphate* (SDS-PAGE) dengan pereaksi terdiri atas Tris HCl 1,5 M dan 0,5 M; larutan SDS; APS; dan TEMED. Selanjutnya protein didenaturasi oleh merkaptoetanol (MeOH).

Tahap kedua dalam WB yaitu pemindahan protein dari gel poliakrilamid ke gel transfer. Tahap ini dipercepat dengan menggunakan arus listrik sebagai faktor pendorong transfer protein. Oleh karena itu, proses pemindahan tersebut disebut juga elektrotransfer. Elektrotransfer dilakukan secara *blotting* setengah kering dengan menggunakan membran nitroselulosa, yang telah dibasahi dengan bufer transfer. Transfer dilakukan selama 10-30 menit dengan arus listrik 200 mA selama 2 jam. Keberhasilan transfer dapat diidentifikasi dengan pewarna Ponceau.

Tahap ketiga merupakan deteksi protein yang telah dipindahkan ke membran nitroselulosa. Deteksi protein memanfaatkan interaksi antara antigen dan antibodi yang bersifat spesifik. Membran nitroselulosa yang telah berhasil menangkap protein selanjutnya diwarnai dengan Ponceau dan dibersihkan dengan menggunakan larutan PBS-tween sampai warna merah Ponceau hilang. Pada membran nitroselulosa selanjutnya ditambahkan larutan *blocking grade* yang berperan memblokir protein yang tidak terwarnai oleh pewarna Ponceau, sehingga antibodi primer akan mengikat protein yang spesifik. Antibodi yang digunakan adalah antibodi primer anti-HIF1 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-1 α My BioSource MBS241603*); antibodi primer antiHIF-2 α (*Rabbit polyclonal anti HIF-2 α NB 100-122*); antibodi primer anti Cygb (*Rabbit polyclonal anti Cygb LifeSpan BioScience LS-C312809*); antibodi sekunder IgG yang bereaksi dengan

antibodi pada kelinci yang ditandai dengan biotin. Antibodi sekunder diencerkan dengan larutan PBS-tween 0,05 % sebesar 1:20.000.

Streptavidin horseradish peroxidase (HRP) dengan pengenceran 1:10.000 digunakan untuk mengikat antibodi sekunder. Streptavidin HRP yang terkonjugasi dengan molekul penanda, selanjutnya dideteksi secara visual dengan penambahan reagen imunostar dengan sensitifitas relatif rendah yaitu 10-20; 10-50; dan 50-100 pg.

3.4.4 Pembuatan sediaan histologi

Jaringan hasil regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*) hasil pertumbuhan 1 hari; 3 hari; 5 hari; 8 hari; 10 hari; 13 hari; 17 hari; 21 hari; 25 hari; dan 30 hari, direndam dalam formalin 10% semalaman untuk difiksasi. Kemudian dilakukan dehidrasi dengan merendam berturut-turut dalam alkohol 70%; 80%; 95%; dan 100% dua kali, yang keseluruhannya dilakukan selama 24 jam. Selanjutnya jaringan dijernihkan dengan merendam dalam xilol dua kali selama 24 jam (setelah 12 jam xilol diganti). Setelah itu dilakukan pembedahan dalam parafin cair.

Setelah sediaan siap, dilakukan pemotongan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-5 μm . Hasil potongan diambil dengan kuas, diletakkan di air agar sediaan melebar tidak mengkerut. Potongan sampel diletakkan berhati-hati di atas permukaan air dalam penangas air bersuhu 40-46⁰C, sehingga irisan mudah untuk dirapikan. Irisan diletakkan di atas kaca objek yang telah diolesi gliserin, yang berfungsi sebagai bahan perekat. Kaca objek yang telah berisi jaringan di atasnya disusun dalam rak khusus dan diinkubasi dalam inkubator suhu 40-60⁰C selama 24 jam sampai sediaan siap diwarnai.

Sediaan histologi yang sudah dibuat siap diwarnai dengan pewarnaan HE sebagai berikut: deparafinisasi dengan merendam sediaan dalam xilol 3 x 3 menit; dehidrasi dengan alkohol bertingkat 100% (3 x 3 menit); alkohol 95% (3 menit); alkohol 90% (3 menit); alkohol 80 % (3 menit); alkohol 70% (3 menit;) dan akuades selama tiga menit. Sediaan diinkubasi dalam larutan hematoksilin selama 2 menit. Sediaan dicuci dengan air mengalir 10 menit dan selanjutnya dicelupkan dalam larutan eosin 3-5 celup. Selanjutnya sediaan dicelupkan ke dalam larutan alkohol bertingkat 70%; 90 %; dan 100 % masing-masing 2 x 5 celup. Sediaan dikeringkan sebentar dan direndam dalam larutan xilol 2 x 2

menit dan ditambahkan larutan perekat (*Canada balsam*) satu tetes lalu ditutup dengan kaca penutup.

3.4.5 Pembuatan sediaan imunohistokimia (IHK)

Sediaan histologi yang sudah dibuat, sampai pada tahap deparafinisasi, tahapan yang sama dengan tahapan sediaan histologi dengan pewarnaan HE, siap untuk dilakukan pewarnaan dengan uji IHK untuk mendeteksi keberadaan protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb pada jaringan. Setelah dilakukan deparafinisasi, sediaan dibiarkan dalam air mengalir selama 1 menit. Sediaan ditetesi 4 tetes larutan peroksidase dan diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya sediaan dicuci dengan air mengalir. Untuk proses *retrieval* antigen, sediaan dipanaskan dalam larutan sitrat dengan menggunakan panci bertekanan tinggi pada suhu 90⁰C selama 40 menit, dan dibiarkan dingin selama 30 menit. Sediaan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan masing-masing diinkubasi selama 3 menit. Sediaan dilingkari dengan menggunakan spidol khusus, sebagai batas pada pemberian larutan selanjutnya. Antibodi primer HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb diencerkan dalam larutan PBS masing-masing sebesar 1:100; 1:200; dan 1:200. Larutan antibodi ditetaskan pada sediaan yang telah dilingkari sebanyak 2 tetes dalam kotak pelembab. Sediaan disimpan dalam lemari es suhu 4⁰C dan biarkan semalaman.

Keesokan harinya sediaan dicuci dengan PBS 3 kali 3 menit. Selanjutnya ditetesi antibodi sekunder Trekkie Universal dan inkubasi selama 30 menit dalam kotak pelembab. Sediaan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan masing-masing diinkubasi selama 3 menit. Trekavidin HRP yang telah terkonjugasi dengan molekul penanda ditetaskan ke sediaan dan diinkubasi selama 10 menit. Sediaan dicuci dengan merendam dalam PBS 3 kali dan diinkubasi selama masing-masing 3 menit. Larutan diaminobenzidine (DAB) kromogen 10 x ditetaskan pada sediaan sambil diamati di bawah mikroskop untuk mengamati pembentukan warna. Setelah warna mencukupi dicuci dengan aquabidestilata untuk menghentikan reaksi warna. Selanjutnya sediaan dicelupkan dalam larutan hematoksilin sebanyak 3 celup, dan dicuci dengan air mengalir. Sediaan dicelupkan dalam larutan eosin sebanyak 3 celup dan sediaan dicuci kembali dengan air mengalir. Dilakukan didehidrasi secara bertingkat selama tiga menit dalam alkohol bertingkat dan xilol. Sediaan selanjutnya ditetesi perekat dan ditutup dengan kaca penutup, dan siap untuk diamati.

3.4.6 Analisis semi kuantitatif sediaan histologi dan imunohistokimia

3.4.6.1 Analisis semi kuantitatif sediaan imunohistokimia

Penilaian semi kuantitatif proporsi warna hasil IHK dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Immunoratio* version 1.0c; 14.2.2011. Perangkat lunak *Immunoratio* dapat diakses secara gratis baik secara *online* atau *offline* yang dapat diunduh dari alamat website <http://software/immunoratio/index.html>. Pada awalnya perangkat lunak ini dirancang untuk analisis antibodi protein penanda kanker payudara, namun kini telah digunakan juga untuk analisis protein HIF-2 α .⁷¹ Pengamatan dilakukan dalam 5 bidang pandang untuk setiap sediaan yang berpindah sesuai arah jarum jam pada perbesaran 40 x 10. Gambar hasil pengamatan mikroskop dibidik dengan kamera dan gambar disimpan dalam bentuk file jpg.

Penghitungan semi kuantitatif dilakukan dengan pengambilan gambar dari dokumen yang telah tersimpan dalam perangkat keras. Gambar selanjutnya di-*scanning* oleh program *Immunoratio*. Titik atau area pewarnaan coklat yang menandakan adanya ikatan antigen dan antibodi akan ditandai oleh perangkat lunak *Immunoratio* menjadi tampak berwarna oranye, sedangkan area yang tidak ada ikatan antigen dan antibodi akan berwarna abu-abu. Area berwarna oranye akan dinilai dengan persentase dibandingkan keseluruhan area bidang pandang (Gambar 3.6). Perangkat lunak *Image J* yang digunakan dengan sistem *online* pada komputer dengan sistem operasi *Microsoft Windows XP SP 2* 32-bit. *Processor* yang digunakan adalah AMD Athlon(tm) 64 X2 Dual Core 5000+, *Random Access Memory* (RAM) yang digunakan sebesar 1,87 GB.

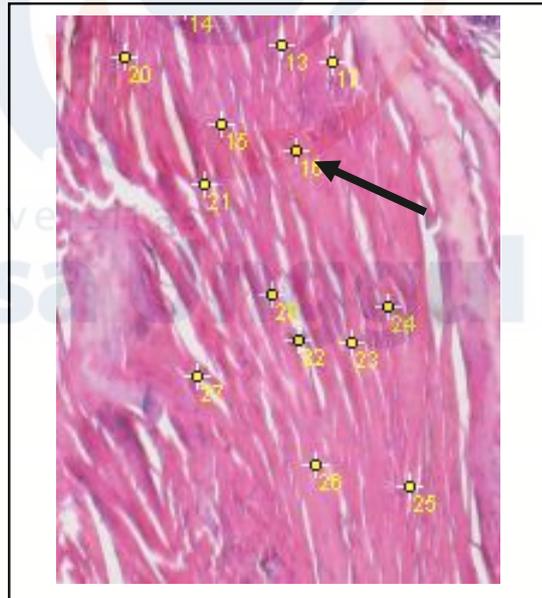


Gambar 3.6 Proses *scanning* dengan perangkat lunak *ImmunoRatio* secara online

3.4.6.2 Penghitungan semi kuantitatif sediaan HE dengan program *ImageJ* I-46

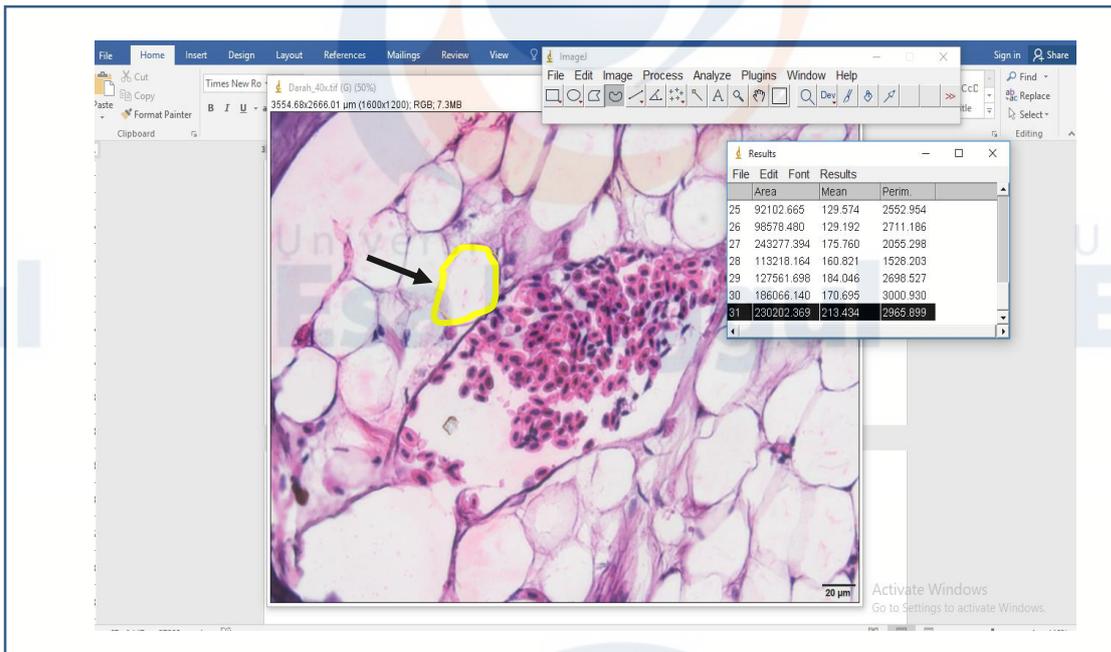
Perangkat lunak *ImageJ* I-46 merupakan perangkat lunak yang memiliki berbagai fitur yang dapat digunakan dalam analisis semi kuantitatif sediaan histologi dengan pewarnaan HE. Pada perangkat lunak *Image J* ini dapat dilakukan penghitungan jumlah sel serta pengukuran panjang atau luas sel serta jaringan. Perangkat lunak *Image J* dapat diunduh secara gratis dan digunakan secara *offline*.^{71,72}

Pengukuran jumlah sel yang tidak diwarnai spesifik dapat dihitung dengan manual namun dapat dibantu penomorannya oleh *ImageJ*, dengan cara membuka file, kemudian pilih fitur *multi point* dan sel yang akan dihitung ditandai sehingga muncul angka yang menunjukkan jumlah sel yang telah ditandai (Gambar 3.7).⁷³



Gambar 3.7 Proses penghitungan jumlah sel pada sediaan histologi dengan pewarnaan HE menggunakan perangkat lunak *Image J*. Tanda panah menunjukkan adanya angka berwarna kuning yang menunjukkan sel telah ditandai dan dihitung pada bidang pandang dengan perbesaran 40 x 10

Penghitungan panjang atau luas sel serta jaringan, dilakukan dengan membuka file gambar histologi terlebih dahulu, dan dilakukan pengaturan skala gambar dengan menggunakan fitur *set scale*. Untuk penghitungan panjang digunakan fitur gambar garis sedangkan untuk luas digunakan fitur kurva. Hasil penghitungan didapat secara otomatis dengan menggunakan fitur *measure* (Gambar 3.8).⁷³

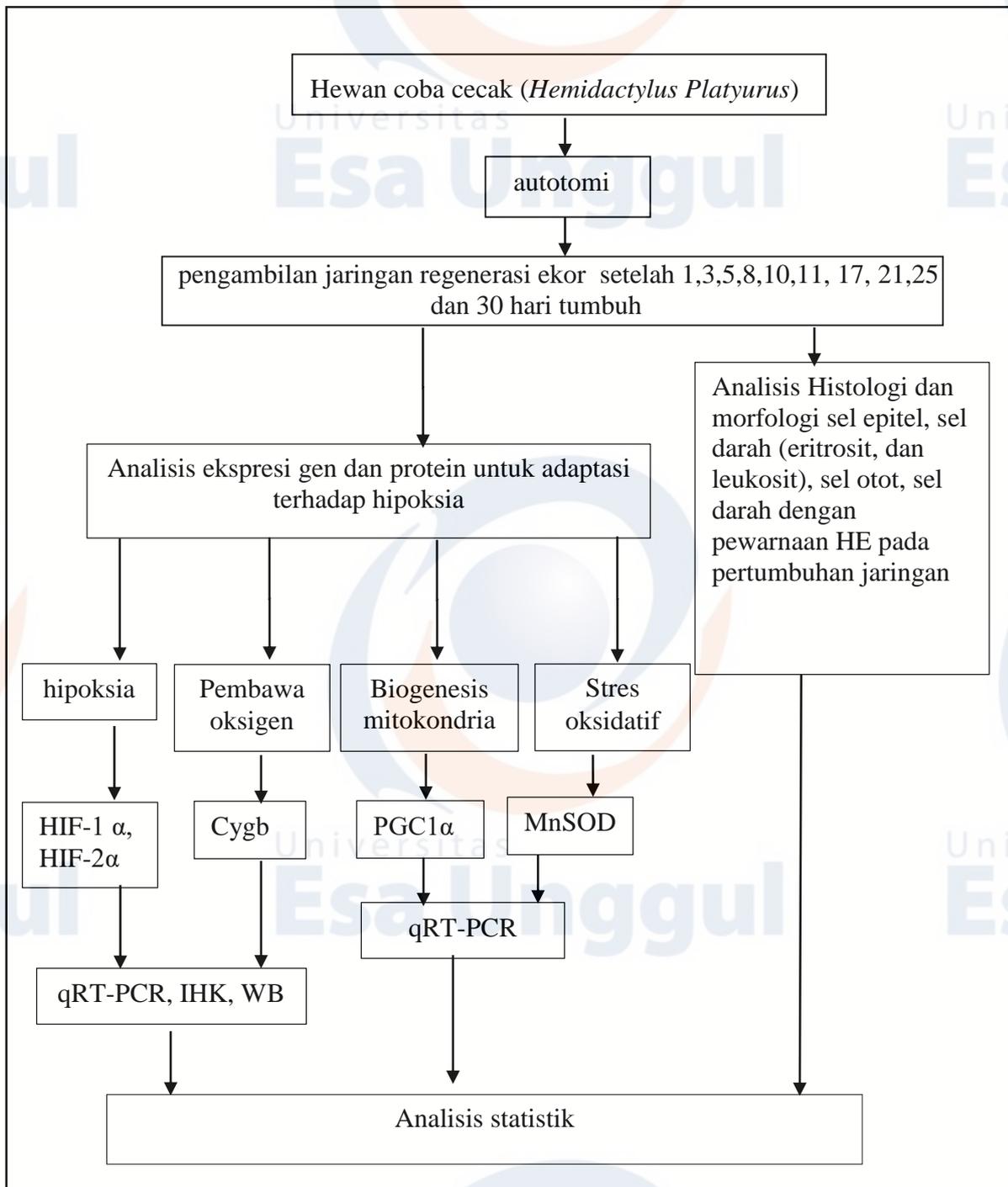


Gambar 3.8 Penghitungan luas sel dengan menggunakan perangkat lunak *Image J*. Tanda panah menunjukkan adanya garis kuning yang melingkari area sel yang akan diukur.

3.5 Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan untuk melihat apakah data berdistribusi secara normal dan homogen atau tidak. Jika tidak memenuhi standar tersebut dilakukan transformasi data dan dilakukan kembali uji normalitas. Jika data yang diperoleh ternyata homogen dan normal maka dilakukan uji parametrik. Sebaliknya jika data yang telah ditransformasi masih berdistribusi tidak normal maka digunakan uji non parametrik.⁷⁴

3.6 Alur Penelitian

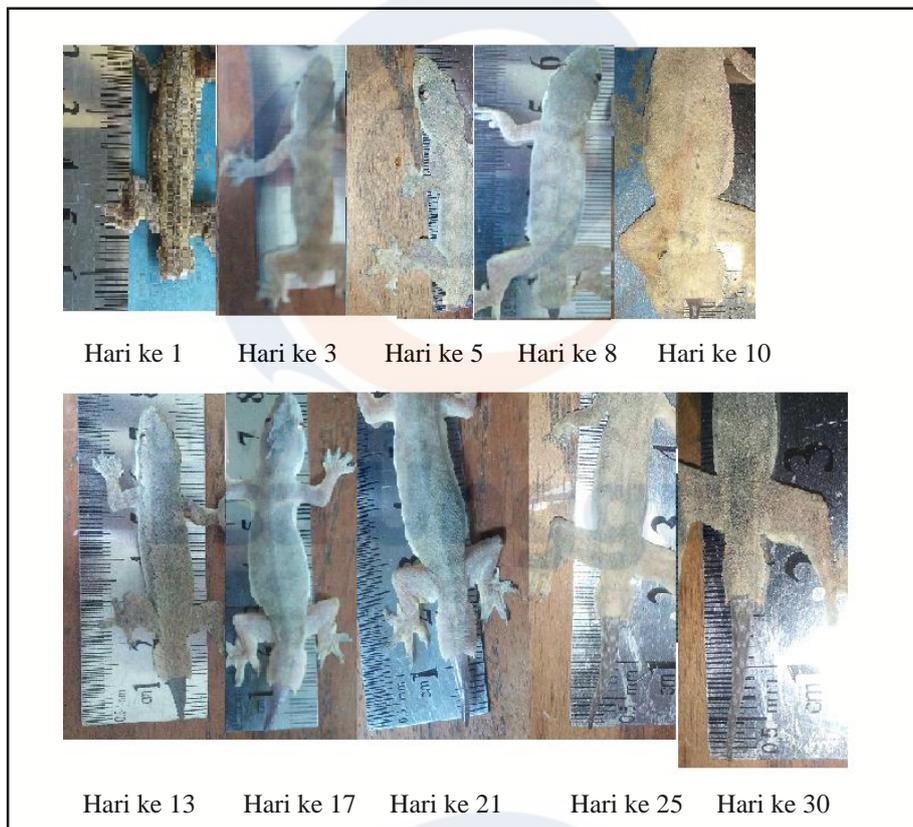


Gambar 3.9 Alur penelitian

BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Pertumbuhan Panjang Ekor Cecak

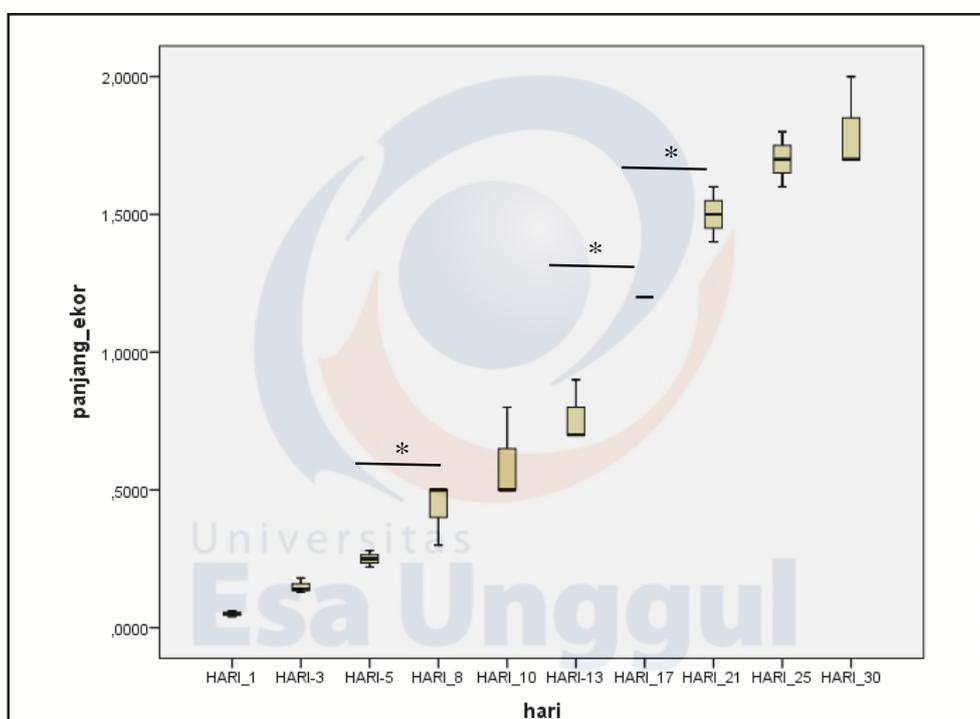
Pertumbuhan panjang ekor cecak pada setiap hari pengamatan diukur dari pangkal ekor hasil regenerasi jaringan sampai ujung ekor hasil regenerasi (Gambar 4.1). Hasil pengamatan menunjukkan adanya pertumbuhan panjang ekor yang berbeda pada setiap hari pengamatan regenerasi jaringan dari hari ke 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; sampai hari ke 30. Pada hari ke 13 tampak pertumbuhan ekor yang sangat cepat dibandingkan pertumbuhan di hari sebelumnya dan memanjang sangat cepat sampai hari ke 25. Panjang ekor pada hari ke 25 dan ke 30 tampak tidak jauh berbeda.



Gambar 4.1 Pertumbuhan panjang ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) pada regenerasi pasca autotomi hari ke 1 sampai hari ke 30.

Sebaran data pertumbuhan panjang rata-rata ekor cecak menunjukkan data berdistribusi tidak normal ($p < 0.05$), dan tidak homogen pada setiap kelompok hari pertumbuhan. Pada Gambar 4.2, tampak bahwa pertumbuhan panjang ekor berlangsung

secara lambat dari hari ke 1 sampai hari ke 13, meningkat dengan jelas mulai hari ke 13 sampai hari ke 21, dan melambat kembali dari hari ke 21 sampai hari ke 30. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata, dari pertumbuhan panjang ekor pada hari ke 5 dan ke 8, dari hari ke 13 dan ke 17, serta antara hari ke 17 dan hari ke 21. Pada hari ke 1 terjadi penambahan rata-rata panjang ekor sebesar $0,05 \pm 0,01$ cm; hari ke 3 penambahan rata-rata panjang ekor sebesar $0,15 \pm 0,03$ cm; pada hari-5 sebesar $0,25 \pm 0,03$ cm; pada hari-8 sebesar $0,4 \pm 0,1$ cm; hari-10 sebesar $0,5 \pm 0$ cm; hari-13 sebesar $0,8 \pm 0,1$ cm; hari-17 sebesar $1,2 \pm 0,0$ cm; hari-21 sebesar $1,5 \pm 0,1$ cm; hari-25 sebesar $1,7 \pm 0,1$ cm; dan pada hari-30 penambahan rata-rata panjang ekor sebesar $1,8 \pm 0,17$ cm.



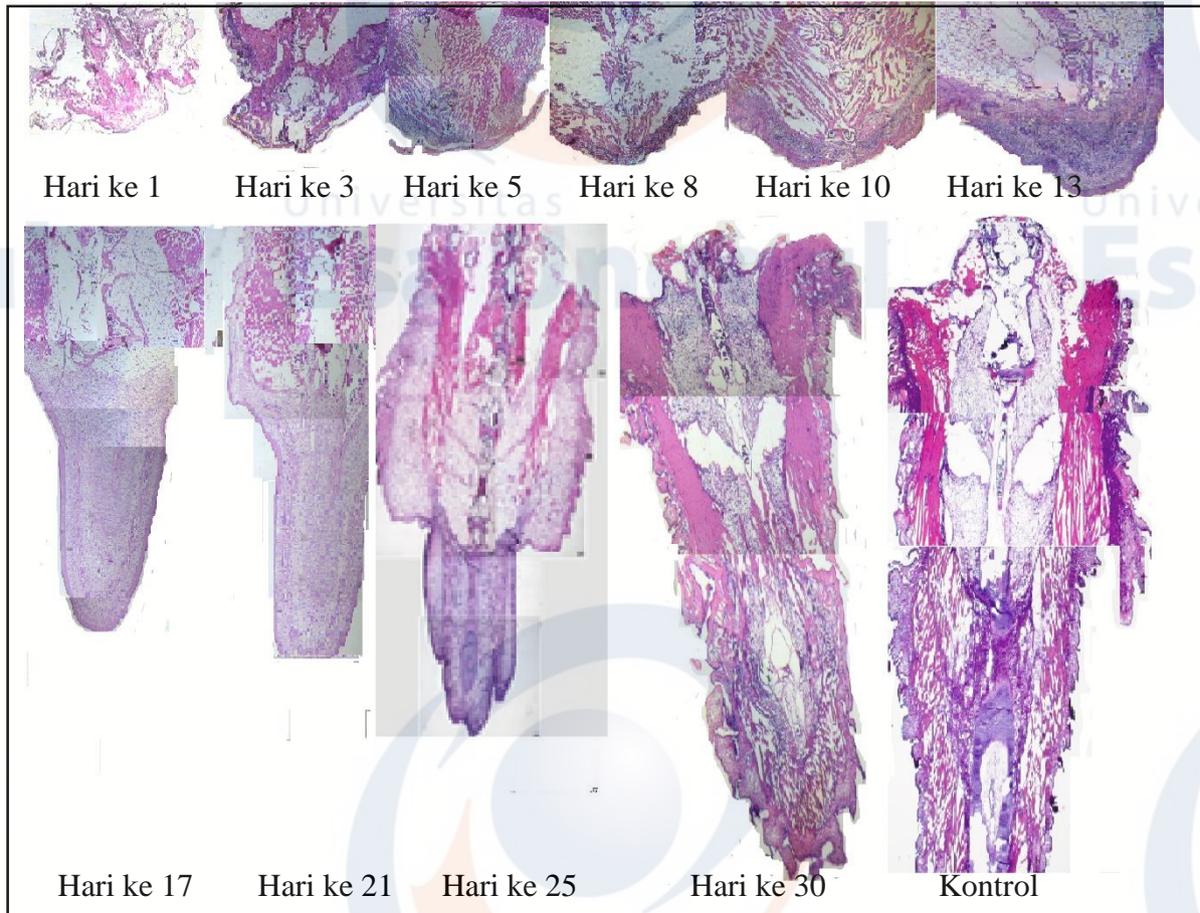
Gambar 4.2 Rata-rata pertumbuhan panjang ekor cecak (cm) dari hari ke 1 sampai hari ke 30, tanda * menunjukkan adanya perbedaan nyata antara kedua kelompok ($p < 0,05$) hasil Uji Kruskal Wallis.

4.2 Analisis Histologis Regenerasi Jaringan

Proses autotomi pada ekor cecak dilakukan pada ruas ke 5 tulang ekor dari pangkal ekor yang merupakan daerah tataran autotomi. Hasil pewarnaan HE menunjukkan perbedaan secara histologi proses regenerasi jaringan pada setiap hari pengamatan yaitu pada hari ke 1; hari ke 3; hari ke 5; hari ke 8; hari ke 10; hari ke 13; hari ke 17; hari ke 21; hari ke 25; dan hari ke 30.

4.2.1 Perbandingan pertumbuhan jaringan keseluruhan

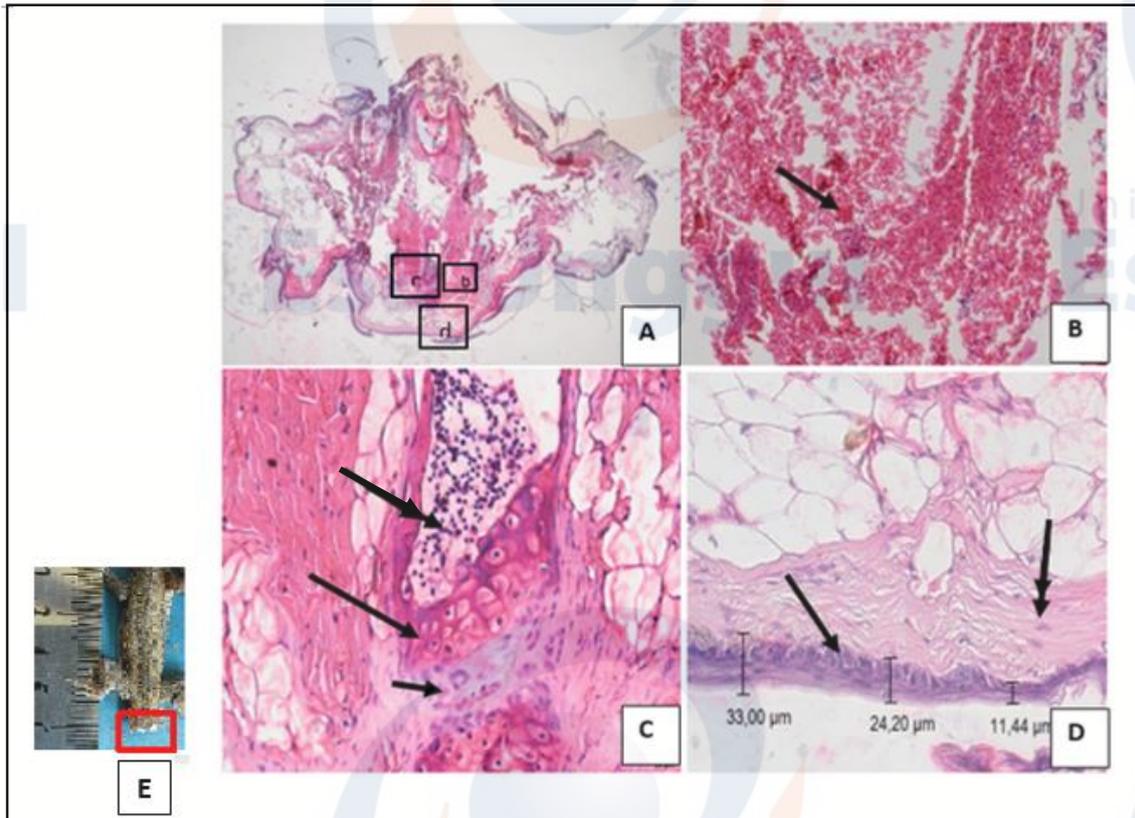
Pertumbuhan jaringan hasil regenerasi jaringan ekor cecak tampak pada Gambar 4.3, yang diamati dari hari ke 1; ke 3; ke 5; ke 8; ke 10; ke 13; ke 17; ke 21; ke 25; dan hari ke 30. Pada hari ke 1 pasca autotomi tampak lapisan epidermis telah terbentuk menutupi area luka. Pada hari ke 5, lapisan epidermis tampak lebih tebal menutupi area luka. Pada hari ke 10, lapisan epidermis dan dermis semakin menebal menutupi area luka. Pertumbuhan ekor semakin cepat pada hari ke 13. Tampak lapisan jaringan ikat yang tebal melindungi pertumbuhan jaringan di bawahnya. Lapisan keratin telah terbentuk dan menutupi lapisan epidermis. Lapisan dermis tampak semakin tebal. Pada hari ke 13, pertumbuhan jaringan menjadi lebih cepat. Pada hari ke 21, ekor bertambah panjang dengan jaringan padat di dalamnya. Pada hari ke 30, ekor telah semakin memanjang disertai dengan pertumbuhan tulang belakang yang semakin memanjang tumbuh dari pangkal ekor sampai ujung ekor. Jaringan ikat dan dermis telah semakin padat dengan struktur morfologi tulang ekor yang memiliki tonjolan kecil seperti morfologi tulang ekor pada kontrol (ekor cecak yang tidak mengalami autotomi). Jaringan lemak tampak memenuhi pangkal ekor sebagai pertanda ekor siap mengalami autotomi kembali.



Gambar 4.3. Perbandingan jaringan ekor secara keseluruhan hasil proses regenerasi jaringan dari hari ke 1 sampai hari ke 30 setelah autotomi dibandingkan dengan kontrol

4.2.2. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 1 setelah autotomi

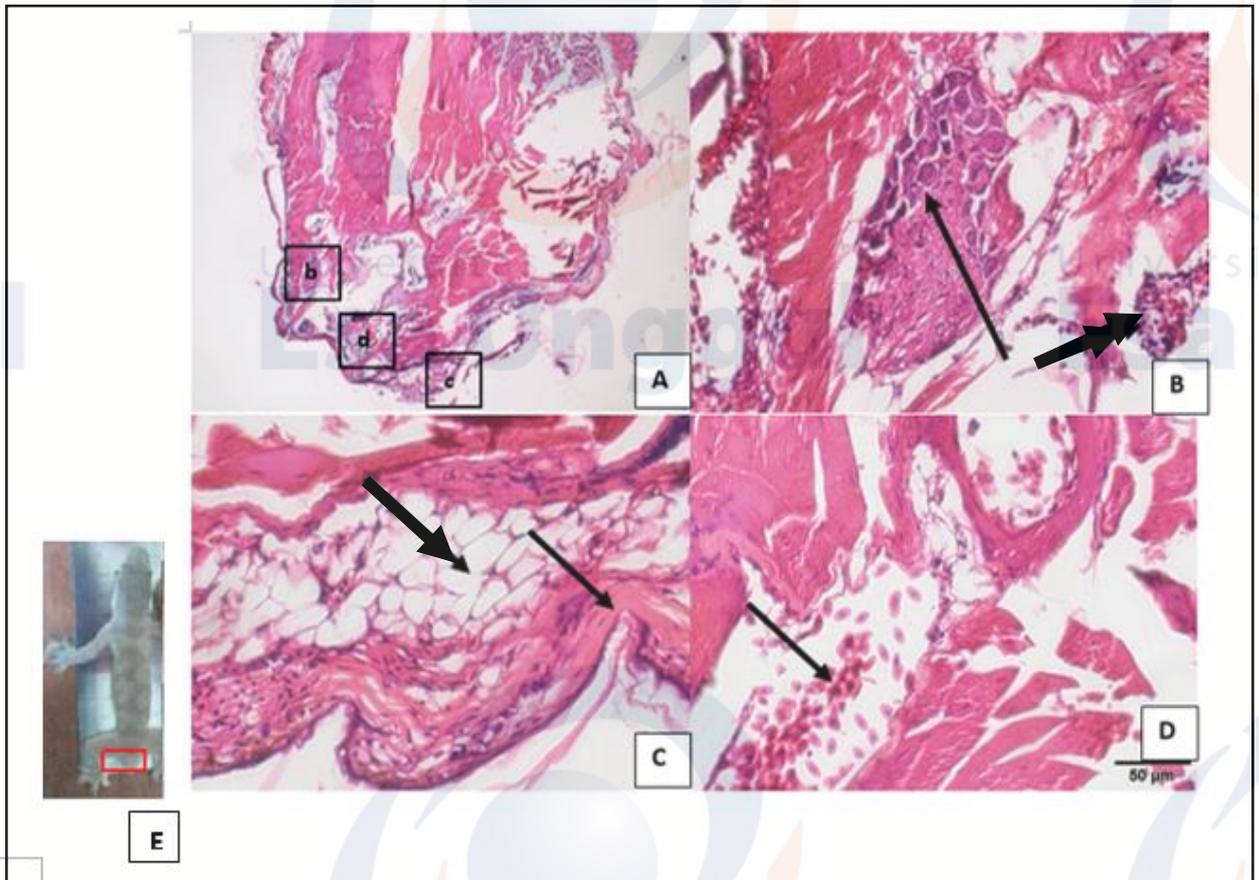
Sediaan histologis HE jaringan ekor cecak satu hari setelah autotomi belum menunjukkan adanya proses atau perubahan morfologis jaringan ekor. Pada Gambar 4.4 tampak bahwa lapisan epidermis sudah terbentuk beserta lapisan keratin. Tampak adanya tulang rawan yang sedang tumbuh, dengan area sel tulang rawan belum matang dikelilingi oleh sel tulang rawan matang yang berkalsium. Sel leukosit tersebar cukup banyak di area luka. Diduga hal tersebut berkaitan dengan fungsinya yaitu membersihkan jaringan dari agen asing dan sel yang mengalami apoptosis. Tampak pula sel eritrosit yang menyebar di area luka yang menunjukkan terjadinya perdarahan di area luka. Sel basal lamina tampak jelas terlihat di lapisan basal yang akan berperan dalam pembentukan lapisan epidermis baru. Di bagian dermis, tampak adanya jaringan kolagen yang banyak mengandung sel mirip fibroblas.



Gambar 4.4 Potongan longitudinal sediaan histologis pada regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 1 setelah autotomi. (A). Gambar keseluruhan jaringan ekor hasil regenerasi. Tampak proses epitelisasi telah terjadi namun lapisan keratin masih terlepas (perbesaran 4 x 10); (B). Sel eritrosit tampak menyebar di area luka; (C). Sebaran leukosit (panah ganda) di area luka; jaringan tulang rawan matang (panah panjang) dikelilingi oleh tulang rawan yang belum matang (panah pendek); (D). Sel basal lamina pada epidermis (panah tunggal) dan sel mirip fibroblas pada jaringan ikat kolagen (panah ganda). Perbesaran (40 x 10); (E). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 1 setelah autotomi.

4.2.3. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 3 setelah autotomi

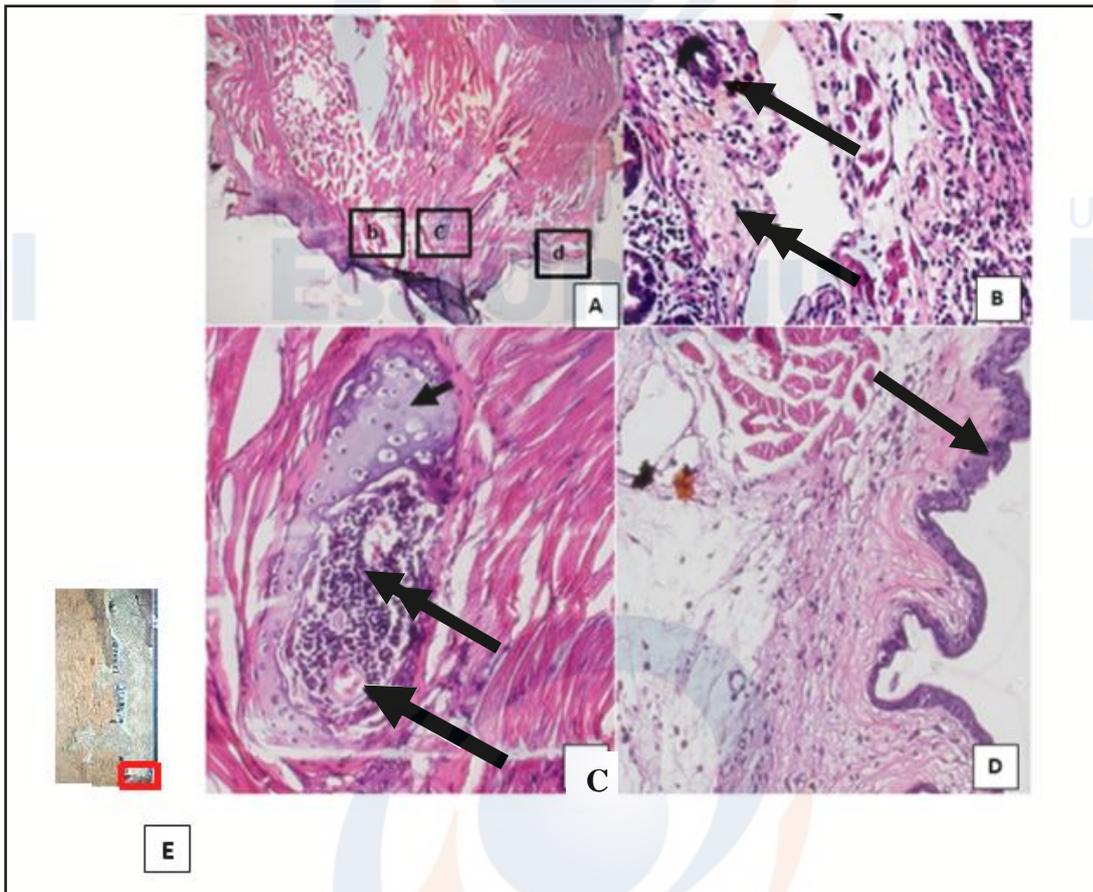
Pada Gambar 4.5 ditampilkan proses regenerasi jaringan ekor cecak pada hari ke 3 setelah proses autotomi. adanya saraf ganglion dan saraf tepi pada area sekitar luka, serta sel eritrosit dan sel leukosit yang banyak menyebar di jaringan. Sel mirip fibroblas menyebar pada lapisan dermis dan jaringan lainnya, serta masih banyaknya penyebaran sel eritrosit pada area luka tersebut.



Gb 4.5 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 3 setelah proses autotomi. (A). Gambar keseluruhan jaringan ekor (perbesaran 4 x 10); (B). Tampak ganglion saraf tepi (panah tunggal) dan sebaran leukosit (panah ganda) di jaringan; (C). Ditemukan sel mirip fibroblas (panah tunggal) dan sel lemak (panah ganda); (D). Eritrosit menyebar di jaringan. Perbesaran 40 x10; (E). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 3 setelah autotomi.

4.2.4. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 5 setelah autotomi

Perkembangan jaringan pada hari ke 5 setelah autotomi menunjukkan perkembangan yang lebih kompleks dibandingkan hari ke 1 dan ke 3. Pada Gambar 4.6 tampak sel endotel mulai muncul di jaringan ikat dan di jaringan tulang rawan, sel basal lamina tampak semakin bertambah pada lapisan basal lamina epitel.

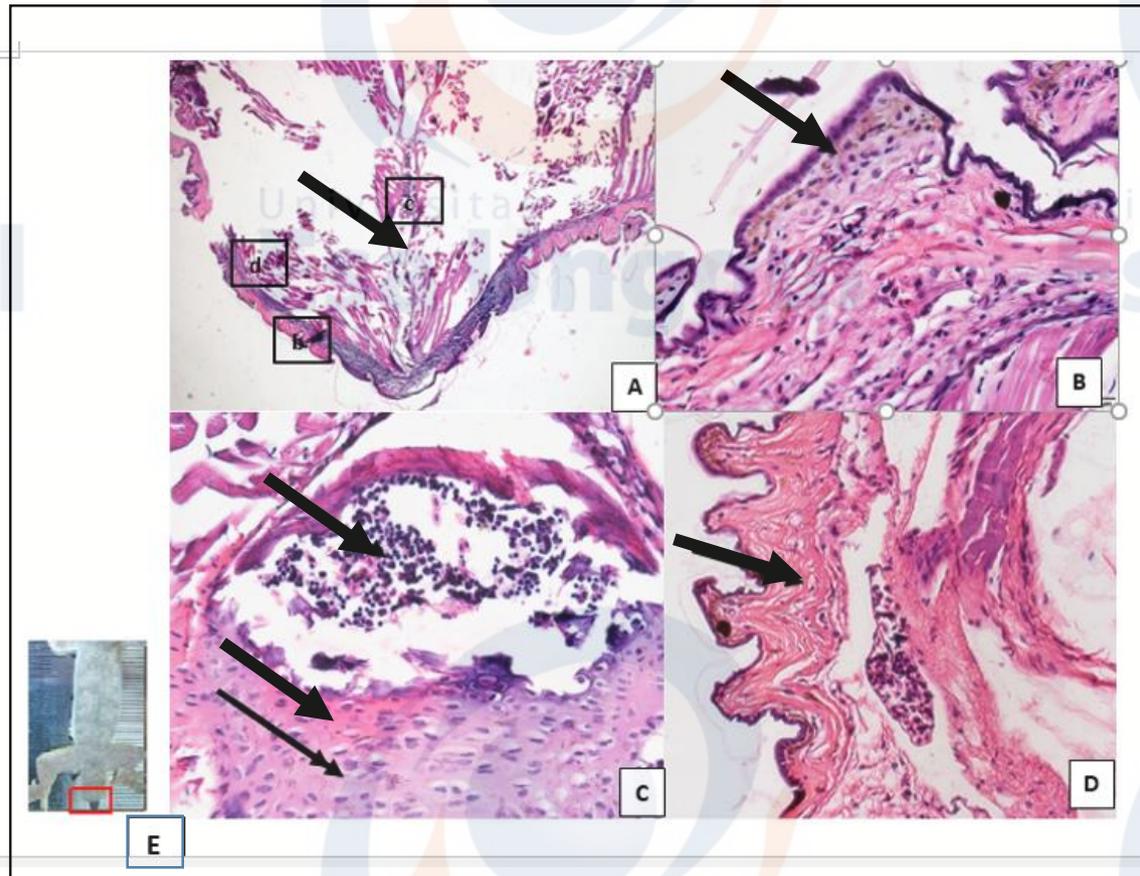


Gambar 4.6 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 5 setelah proses autotomi.

(A). Gambar keseluruhan jaringan ekor hasil regenerasi (perbesaran 4 x 10). B, C, dan D jaringan pada perbesaran 40 x 10; (B). Tampak sel endotel mulai muncul (panah tunggal) dan sebaran leukosit (panah ganda); (C). Sebaran leukosit pada jaringan tulang rawan (panah ganda), tampak sel endotel dan eritrosit (panah besar tunggal) serta tulang rawan belum matang di antara tulang rawan matang (panah pendek); (D). Sel basal lamina. Perbesaran 40 x 10; (E). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 5 setelah autotomi.

4.2.5. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 8 setelah autotomi

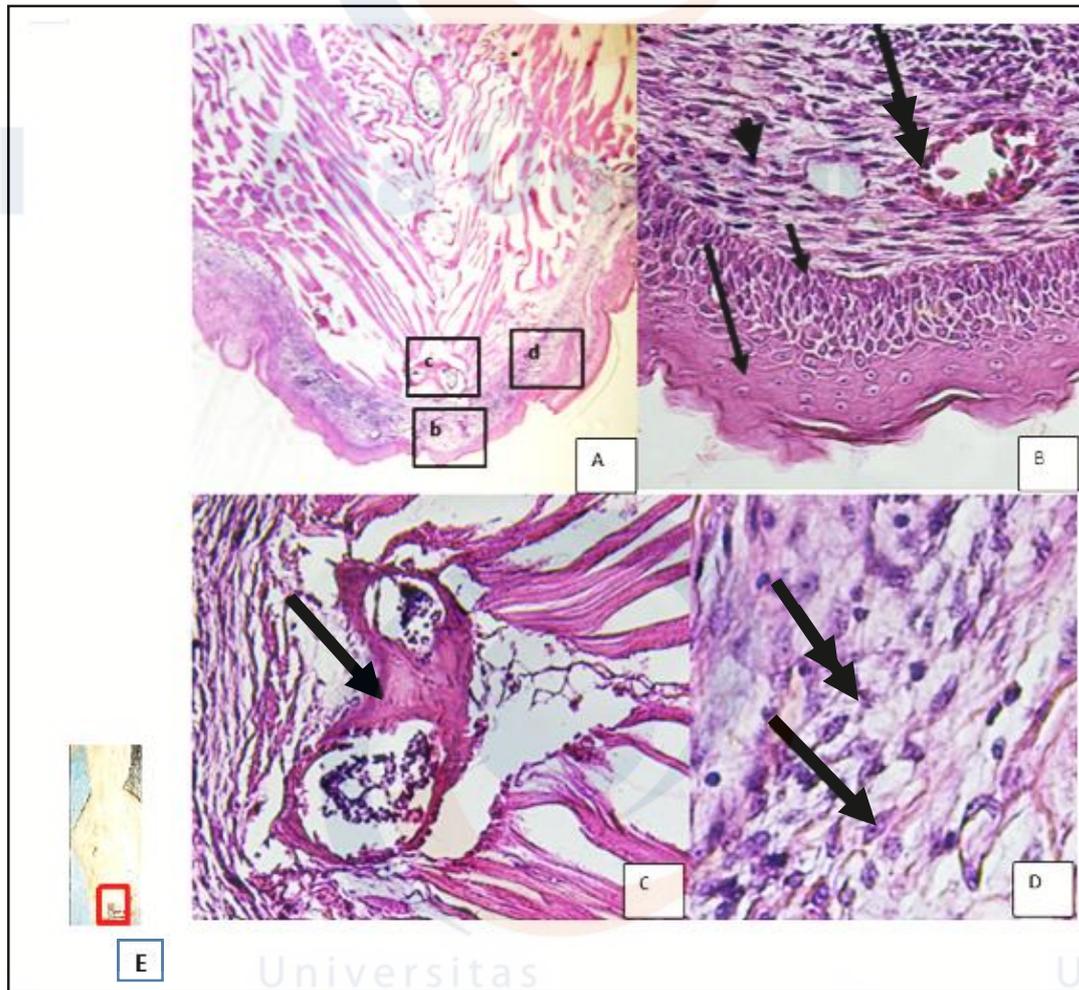
Pada Gambar 4.7 tampak sediaan histologis regenerasi jaringan ekor cecak pada hari ke 8 setelah autotomi. Pada hari ke 8 mulai terjadi pembentukan tulang belakang yang semakin terlihat jelas memanjang, lapisan epidermis semakin tebal serta sel leukosit dan sel mirip fibroblas semakin banyak menyebar ke seluruh jaringan.



Gb 4.7 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 8 setelah autotomi. (A). Regenerasi jaringan ekor secara keseluruhan (perbesaran 4 x 10), terlihat pertumbuhan tulang belakang yang memanjang. (B). Tampak sebaran leukosit di seluruh jaringan; (C). Sebaran leukosit di jaringan tulang rawan (panah tunggal) dan jaringan tulang rawan belum matang (panah ganda); (D). Tampak sel mirip fibroblas pada jaringan ikat kolagen. Perbesaran sediaan 40 x 10; (E). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 8 setelah autotomi.

4.2.6. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 10 setelah autotomi

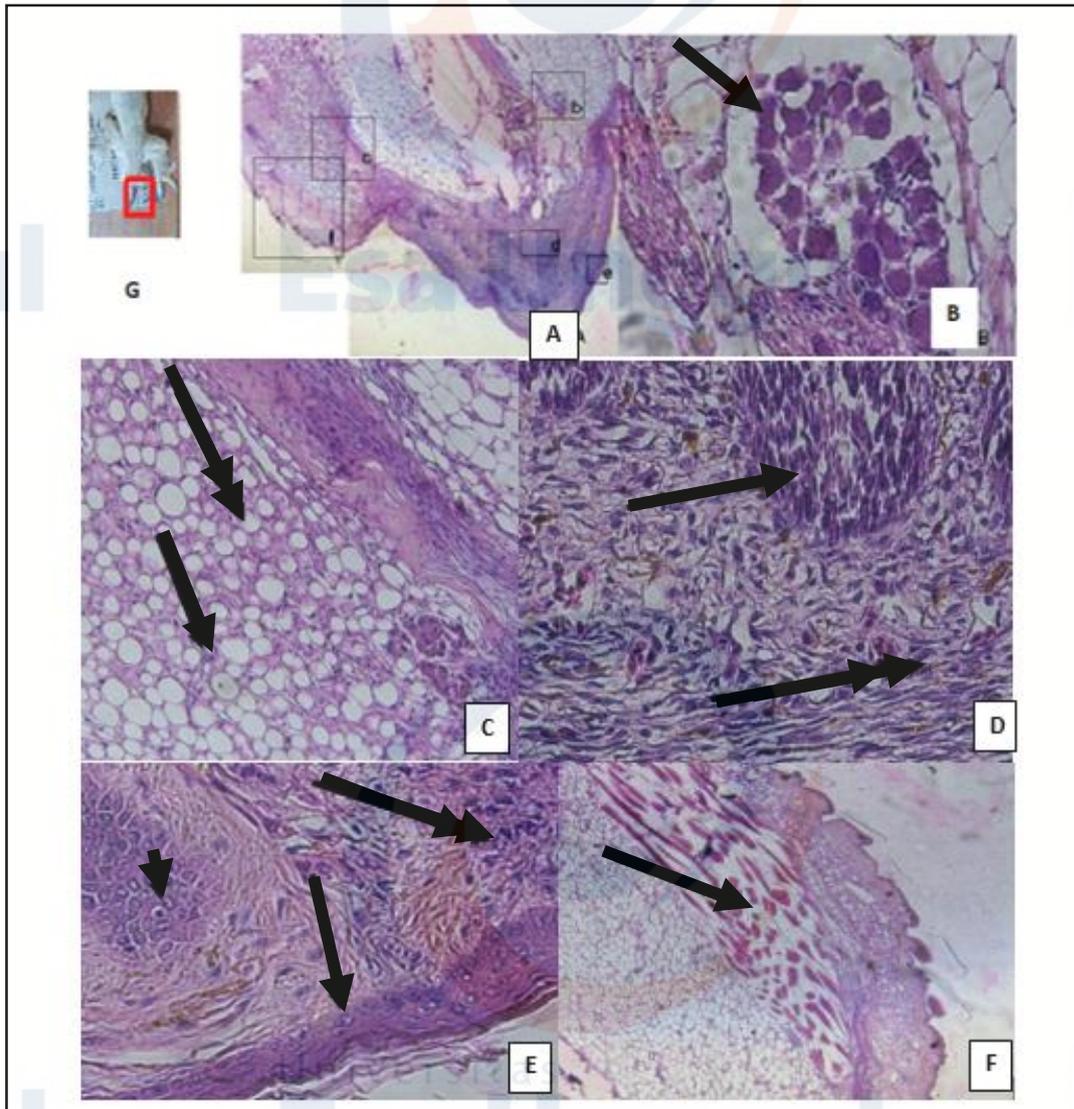
Pada Gambar 4.8 ditampilkan secara histologis regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 10 setelah autotomi. Tampak epidermis semakin menebal dan perubahan bentuk sel epidermis yang semula bulat menjadi pipih serta sel basal lamina membentuk epidermis baru. Tulang belakang semakin jelas terlihat memanjang. Sel endotel semakin banyak membentuk pembuluh darah yang terisi eritrosit baru. Tampak pula jaringan lemak, serta sebaran sel mesenkim, sel saraf, dan sel mirip fibroblas pada lapisan dermis.



Gb 4.8 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 10 setelah autotomi. (A). Gambaran histologi jaringan ekor secara keseluruhan (perbesaran 4 x10). (B). Terlihat perubahan bentuk sel epidermis dari bulat kemudian memipih (panah hitam tunggal) serta sel basal lamina (panah pendek), sel mirip fibroblas (kepala panah) dan sel endotel (panah ganda) (C). Tampak jaringan tulang rawan belum matang yang dikelilingi jaringan tulang rawan matang; (D). Tampak sel mesenkim (panah tunggal) pada jaringan lemak dan sel neuron (panah ganda). Perbesaran sediaan 40 x 10; (E). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 10 setelah autotomi.

4.2.7. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 13 setelah autotomi

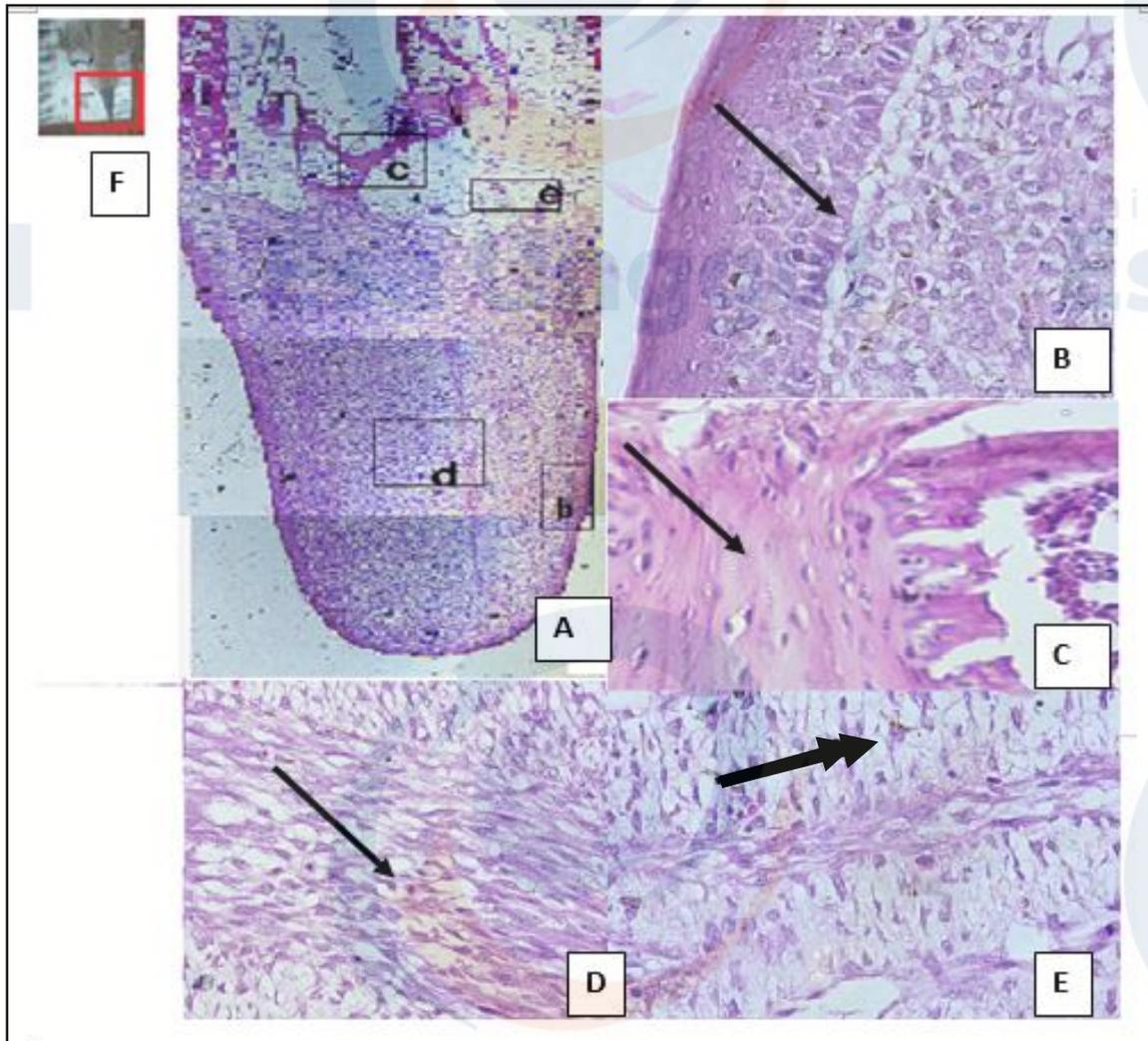
Pada gambar 4.9 ditampilkan sediaan histologis regenerasi jaringan ekor cecak pada hari ke 13 setelah autotomi, yang semakin padat dan kompleks. Tampak sel ganglion serta penyebaran sel neuron yang diduga berperan dalam regenerasi jaringan ekor cecak. Tampak pula agregat sel yang kaya akan sel punca bakal jaringan sel otot. Sel mesenkim, sel mirip fibroblas, dan sel basal lamina tampak menyebar semakin banyak di lapisan dermis, yang berperan sebagai sel punca.



Gambar 4.9 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 13 setelah autotomi. (A) Gambaran menyeluruh regenerasi jaringan ekor cecak (perbesaran 4 x 10); (B) Tampak saraf ganglion tepi; (C) Jaringan lemak baru (panah ganda) dan sel mesenkim di antara sel lemak (panah tunggal); (D) agregat sel yang mengandung sel punca otot (panah tunggal), sel mirip fibroblas (panah ganda); (E) Sel basal lamina (panah tunggal), sel saraf (panah ganda) (F) Sel otot baru. Perbesaran sediaan 40x10; (G) Ekor cecak hasil regenerasi hari-13 setelah autotomi.

4.2.8. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 17 setelah autotomi

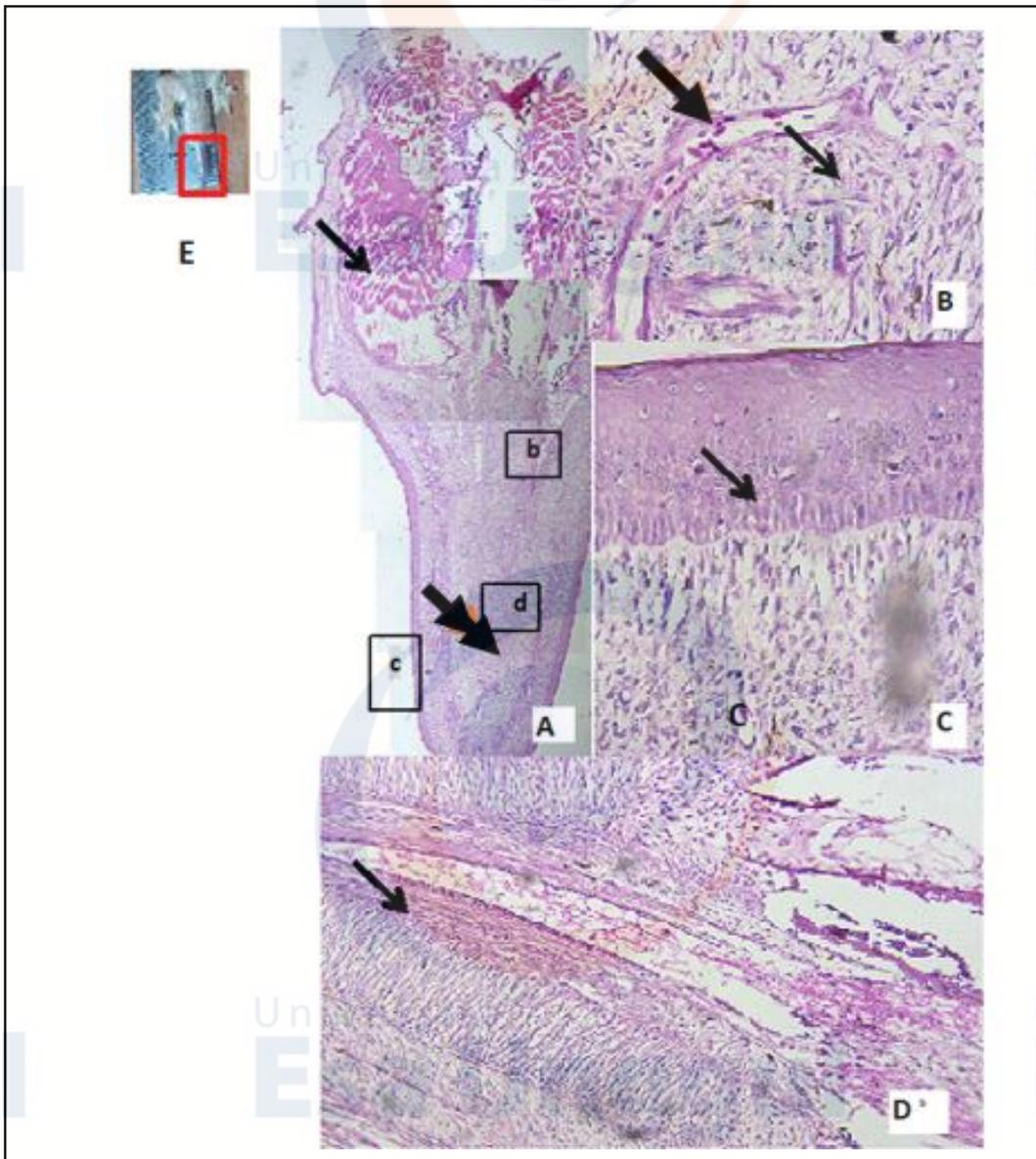
Pada Gambar 4.10 ditampilkan hasil regenerasi jaringan ekor cecak setelah 17 hari proses autotomi. Tampak ada penebalan dan pepadatan jaringan epidermis, dermis, serta jaringan ikat. Jaringan ekor terlihat semakin memanjang secara signifikan mulai dari hari ke 13. Masih banyak tersebar sel punca antara lain sel basal lamina, sel mirip fibroblas, dan sel mesenkim yang akan terus membentuk jaringan baru.



Gambar 4.10 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke-17 setelah autotomi. (A). Gambaran histologi keseluruhan jaringan ekor yang beregenerasi hari ke-17 pasca autotomi (perbesaran 4 x 10); (B). Jaringan epidermis dan dermis yang semakin memadat dengan lapisan sel basal lamina; (C). Jaringan tulang rawan yang belum matang; (D). Tampak sel mirip fibroblas di jaringan; (E). sel saraf. Perbesaran 40 x 10; (F). Ekor cecak hasil regenerasi hari ke 17 setelah autotomi.

4.2.9. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 21 setelah autotomi

Pada hari ke 21 pasca autotomi, jaringan regenerasi ekor cecak semakin memadat dengan adanya jaringan ikat, lemak, serta otot yang baru. Sel epidermis menebal disertai penebalan jaringan ikat kolagen seta pembentukan jaringan tulang rawan yang akan membentuk morfologi ekor cecak (Gambar 4.11).

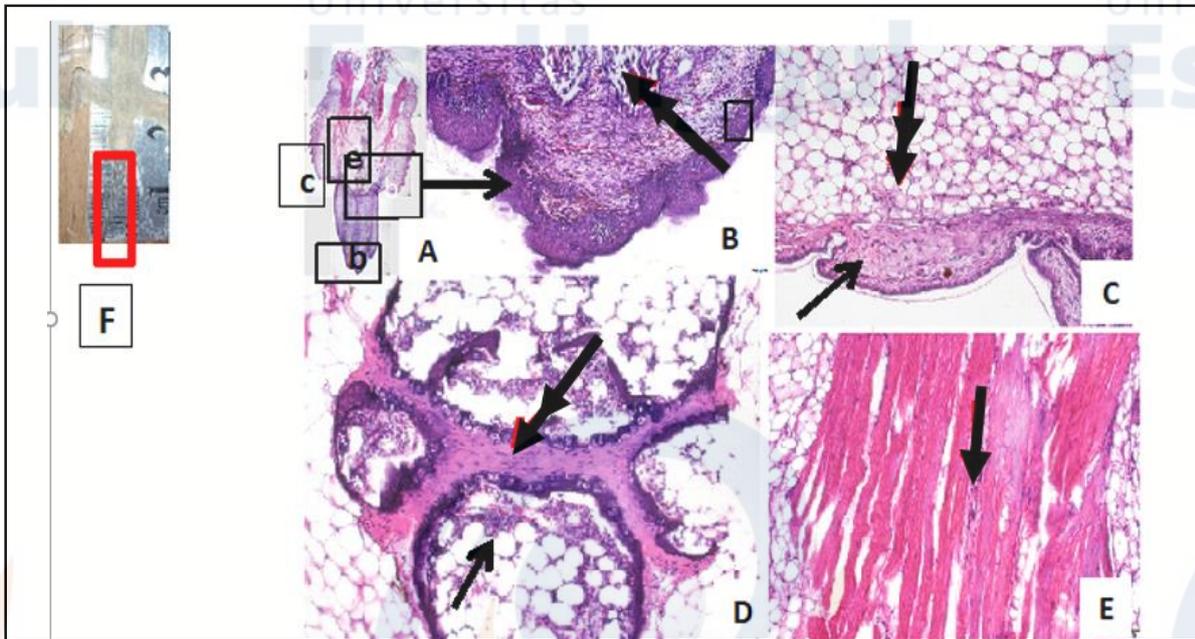


Gambar 4.11 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke-21 setelah autotomi. (A). Gambaran histologis keseluruhan jaringan ekor yang beregenerasi hari ke-21, tampak pembentukan otot baru (panah hitam) serta jaringan tulang rawan yang semakin memadat (panah ganda) (perbesaran 4 x 10); (B). Terlihat pembuluh darah baru (tampak longitudinal) (panah kecil) tampak melintang (panah besar) di jaringan ikat; (C). Jaringan epidermis dan dermis yang semakin memadat; (D). Jaringan tulang rawan. Perbesaran 40 x 10; (E). Regenerasi jaringan ekor cecak setelah hari ke-21 pasca autotomi.

4.2.10. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 25 setelah autotomi.

Hasil regenerasi jaringan ekor cecak pada hari ke 25 pasca autotomi menunjukkan jaringan yang semakin kompleks. Tampak jaringan tulang rawan dengan pola tulang rawan belum matang dan matang yang berulang di sepanjang tulang belakang. Terlihat

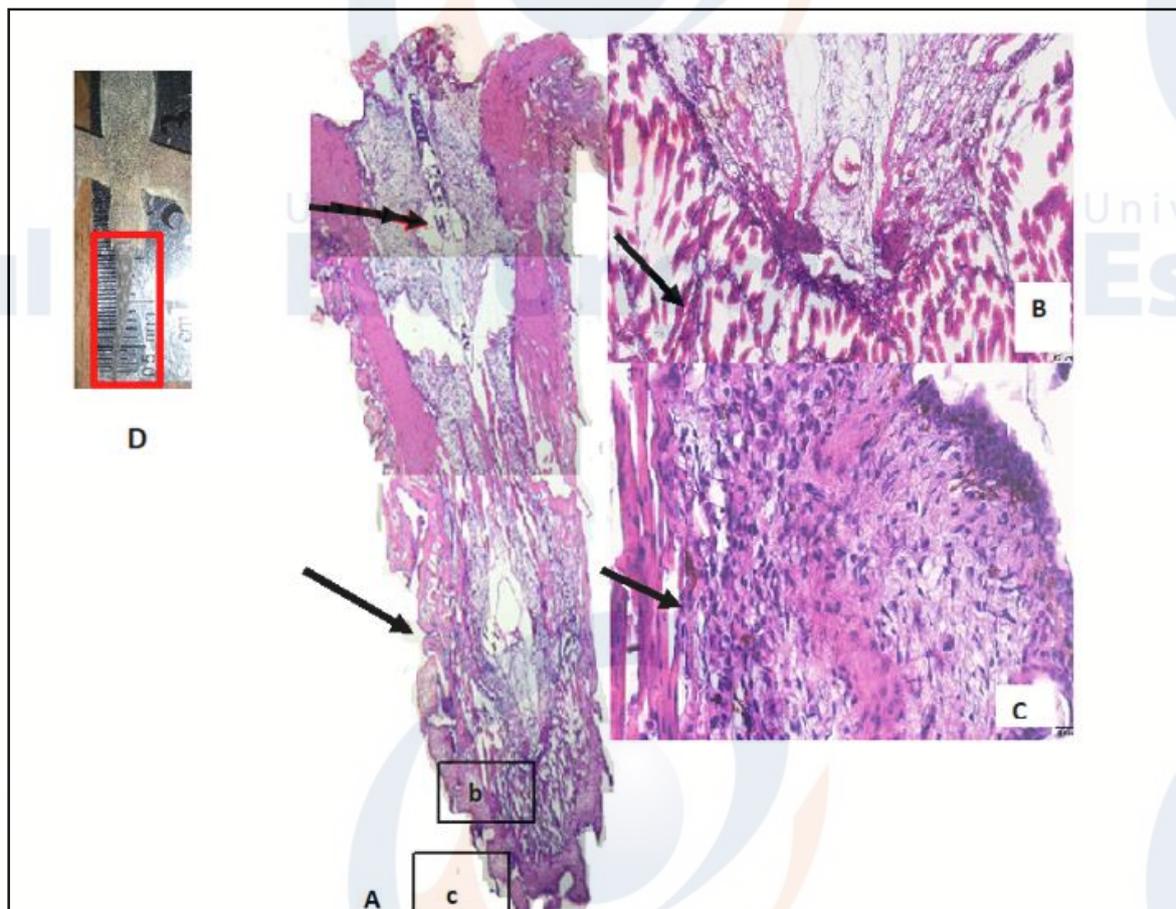
pembentukan sel lemak baru disertai dengan jaringan epidermis yang terbentuk lebih padat. Jaringan otot baru yang memadat, dan mulai tampak adanya pembentukan morfologi ekor cecak (Gambar 4.12).



Gambar 4.12 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 25 setelah autotomi. (A). Gambaran keseluruhan jaringan ekor yang beregenerasi hari ke 25 pasca autotomi (perbesaran 4 x 10); (B). Jaringan epidermis dan dermis yang semakin memadat (panah tunggal) dan agregat sel punca (panah ganda); (C). jaringan lemak baru (panah ganda) dan sel mirip fibroblas pada dermis (panah tunggal); (D). Jaringan tulang rawan belum matang (panah ganda) dan jaringan tulang rawan matang (panah tunggal); (E). Sel mirip fibroblas. Perbesaran 4x 10. (F). ekor cecak hasil regenerasi hari ke-25 setelah autotomi.

4.2.11. Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 30 setelah autotomi

Gambar 4.13 menampilkan Regenerasi Jaringan ekor cecak pada hari ke 30 setelah autotomi. Tampak ekor sudah memanjang menyerupai ekor semula, namun masih mengalami proses morfogenesis dan perpanjangan ekor. Jaringan otot sudah mulai padat dan sel fibroblas pun semakin banyak di jaringan ikat. Sumsum tulang sudah semakin jelas terlihat memanjang. Lapisan epidermis semakin menebal dengan morfologi ekor cecak yang mulai terbentuk.



Gambar 4.13 Regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 30 setelah autotomi. (A). Tampak sumsum tulang yang memanjang dan semakin padat dengan pertumbuhan tulang rawan (panah ganda), terlihat ekor yang sudah terbentuk (panah tunggal) (perbesaran 4x10); (B). Pembentukan otot baru; (C). Lapisan epidermis dan dermis yang semakin padat dan menebal kaya akan sel mirip fibroblas. Perbesaran sediaan 40 x 10. (D). ekor cecak hasil regenerasi setelah hari ke 30 autotomi.

4.3 Data kuantitatif sediaan histologi

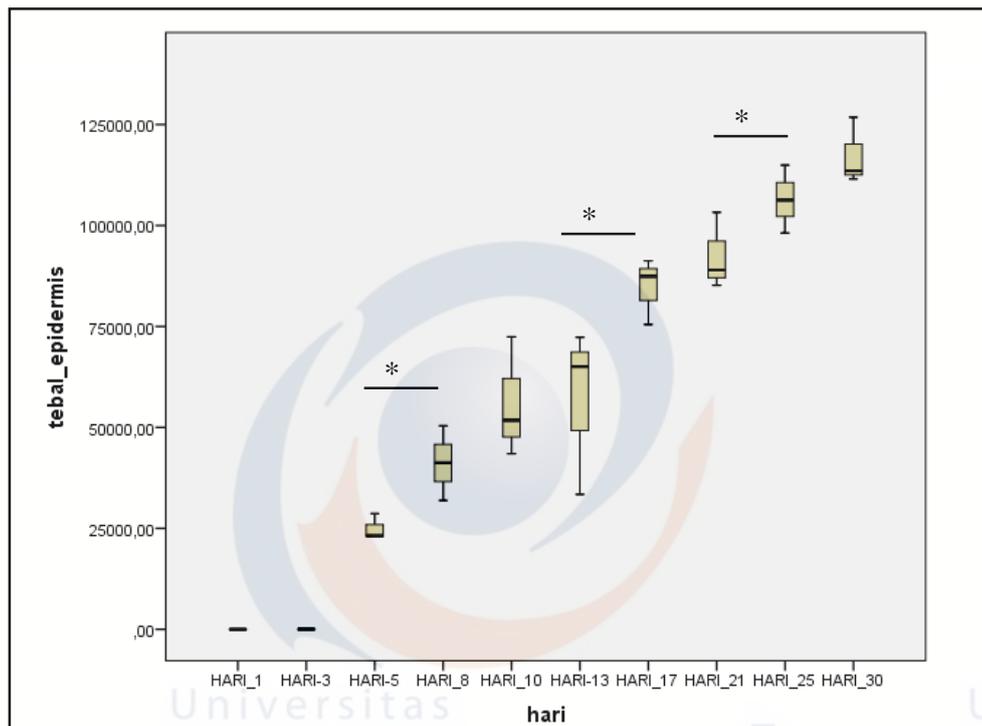
Data kuantitatif sediaan histologi dengan pewarnaan HE meliputi densitas jumlah sel saraf dan sel mirip fibroblas, tebal jaringan epidermis dan dermis, serta luas tulang rawan hasil regenerasi jaringan ekor cecak menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Tebal jaringan dan luas jaringan dinyatakan dengan skala mm. Pengambilan data dilakukan pada 5 lapang pandang pada satu preparat dengan perbesaran 40 x 10.

4.3.1. Ketebalan epidermis dan dermis

Rata-rata ketebalan jaringan epidermis dan dermis diukur pada sediaan histologi hasil regenerasi jaringan dari hari ke 1; 3; 5; 8; 10; 13; 17; 21; 25; dan 30. Pengukuran dilakukan pada skala mm, pada 5 bidang pandang dengan tiga pengulangan pada setiap

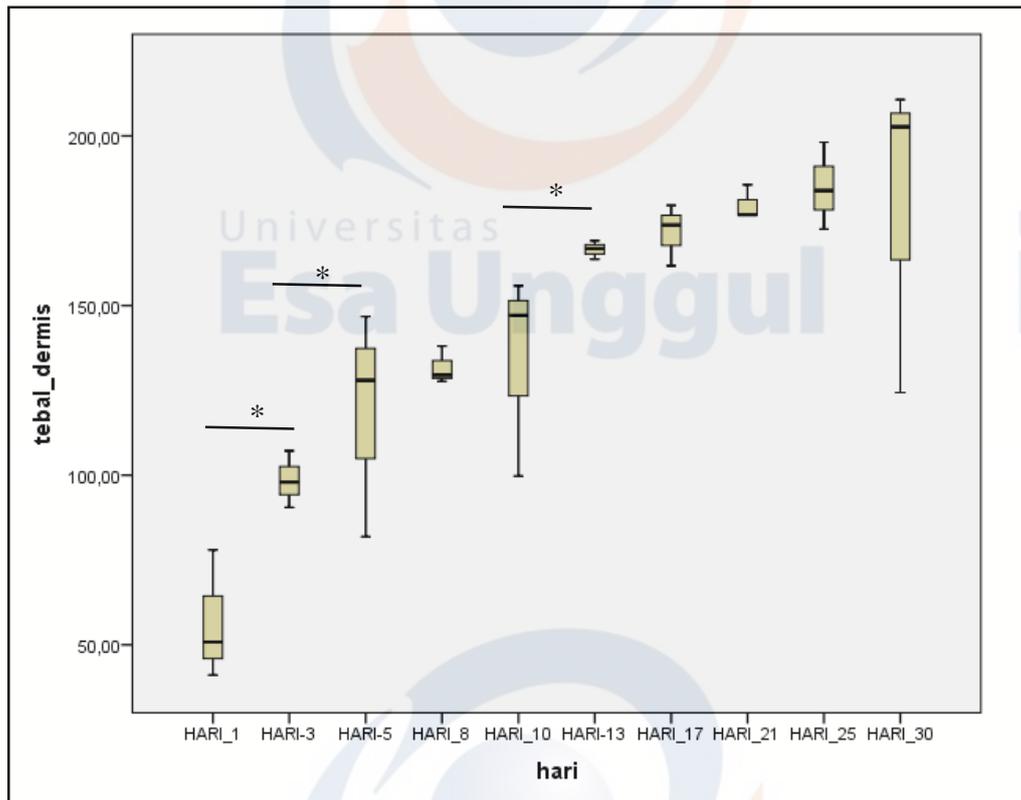
hari pengamatan. Hasil pengamatan disajikan dalam bentuk box plot (gambar 4.14 dan gambar 4,15).

Perbandingan rata-rata tebal epidermis (mm) pada gambar diagram batang 4.14, dengan uji Kruskal Wallis tampak adanya perbedaan secara signifikan antara rata-rata tebal epidermis hari ke 5 dan ke 8, antara hari ke 13 dan 17, serta antara hari ke 21 dan 25.



Gambar 4.14 Rata-rata tebal epidermis (mm) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30 (n = 30). Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata (*) pada kelompok perlakuan hari ke 5 dengan hari ke 8, hari ke 13 dengan hari ke 17, serta hari ke 21 dengan hari ke 25; ($p < 0,05$).

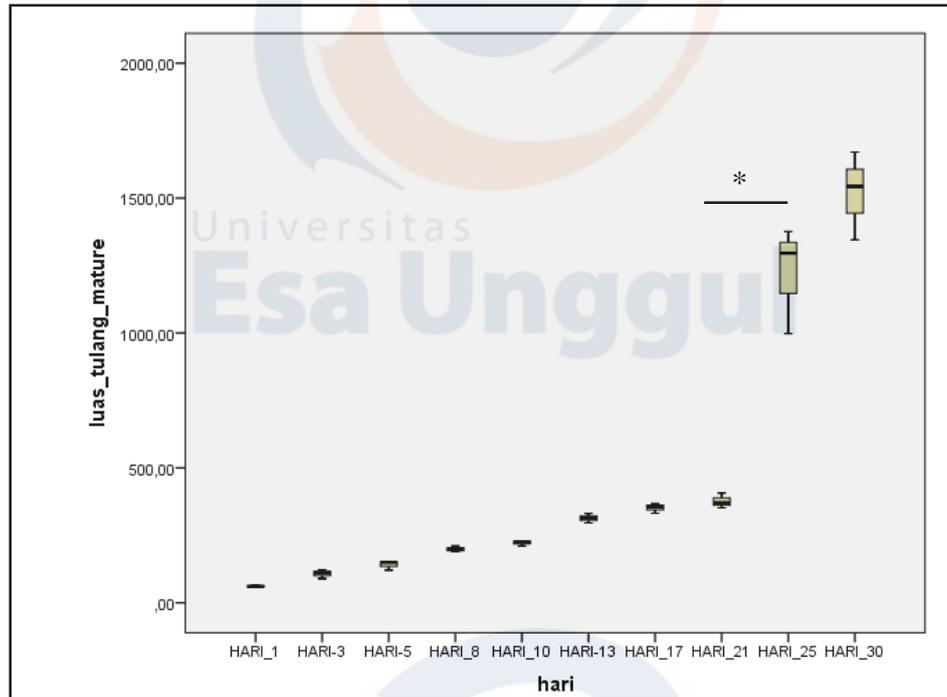
Gambar 4.15 menunjukkan adanya perbedaan rata-rata tebal dermis pada setiap hari pengamatan. Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara tebal dermis pada hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, serta antara hari ke 8 dengan hari ke 10 ($p < 0,05$).



Gambar 4.15. Rata-rata tebal dermis (mm) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30, n = 30, Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan antara hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 3 dengan hari ke 5, serta antara hari ke 10 dengan hari ke 13 ($p < 0,05$).

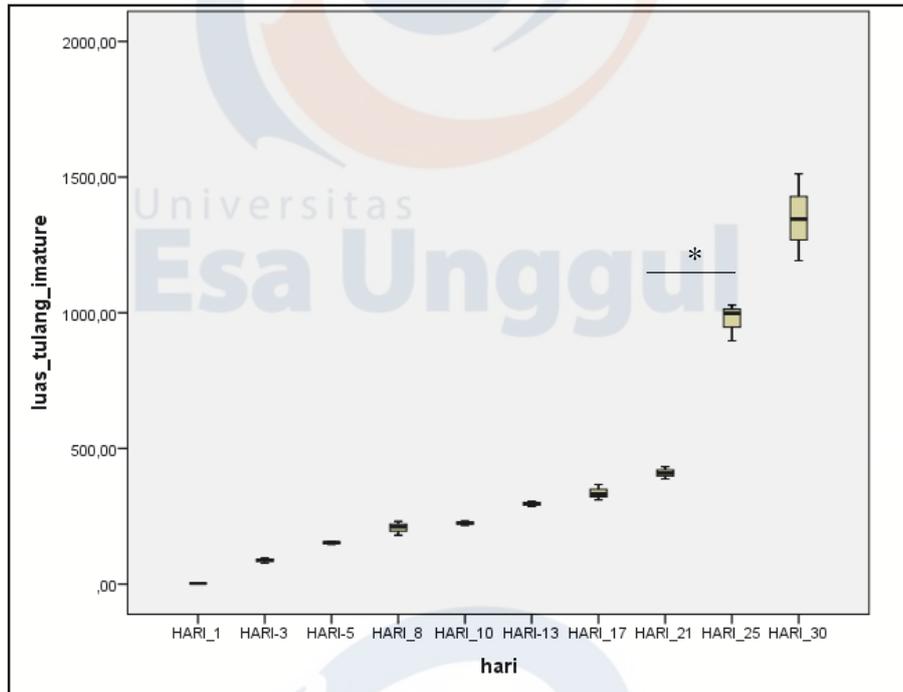
4.3.2 Data luas jaringan tulang rawan

Rata-rata luas jaringan tulang rawan matang hasil regenerasi jaringan pada setiap hari pengamatan, menunjukkan adanya perbedaan nyata antara luas jaringan tulang rawan matang pada hari ke 21 dengan hari ke 25 ($p < 0,05$). Sedangkan pertumbuhan luas jaringan tulang rawan matang pada hari ke 1 sampai hari ke 21 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, walau terlihat adanya perbedaan luas pada setiap hari pengamatan tersebut (gambar 4.16).



Gambar 4.16. Rata-rata luas tulang rawan matang (mm^2) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30. $n=30$, uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara hari ke 21 dan 25 ($p < 0,05$)

Pada gambar 4.17 tampak adanya pertambahan rata-rata luas **jaringan tulang rawan belum matang** (mm^2) yang berbeda secara signifikan pada hari ke 21 dan ke 25, dengan uji Kurskal Wallis, $p < 0,05$). Pertambahan luas jaringan tulang rawan belum matang menunjukkan pola yang sama dengan pertumbuhan luas jaringan tulang rawan matang, pada hari ke 1 sampai hari ke 21, tidak terjadi perbedaan nyata pertumbuhan luas tulang rawan belum matang.

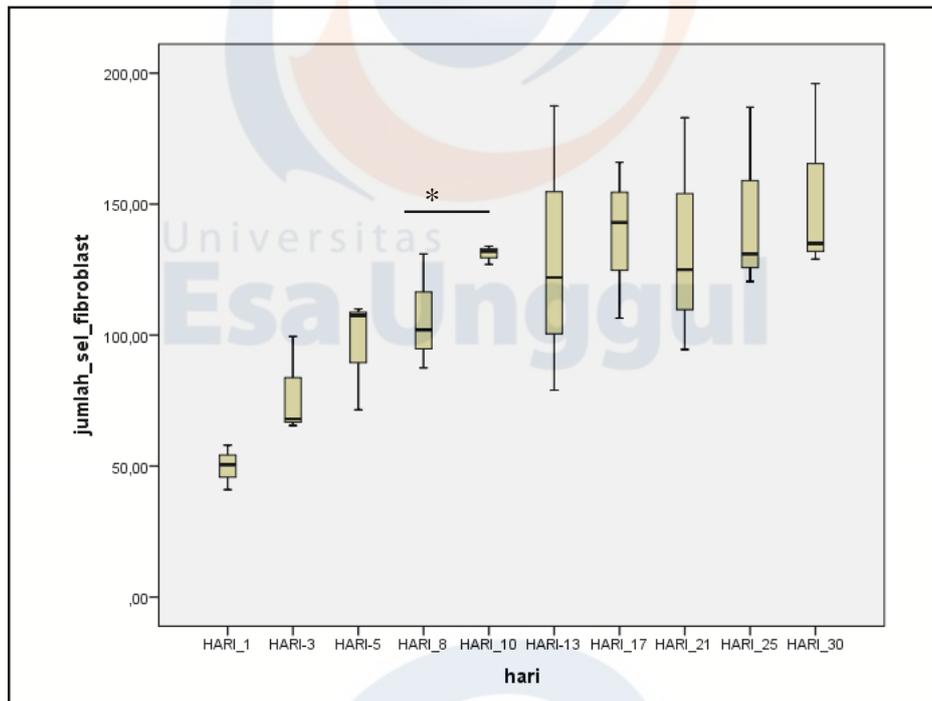


Gambar 4.17. Rata-rata luas tulang rawan belum matang (mm^2) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30, $n = 30$, uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara hari ke 21 dan 25 ($p < 0,05$)

4.3.3 Densitas Sel mirip Fibroblas dan Sel Saraf

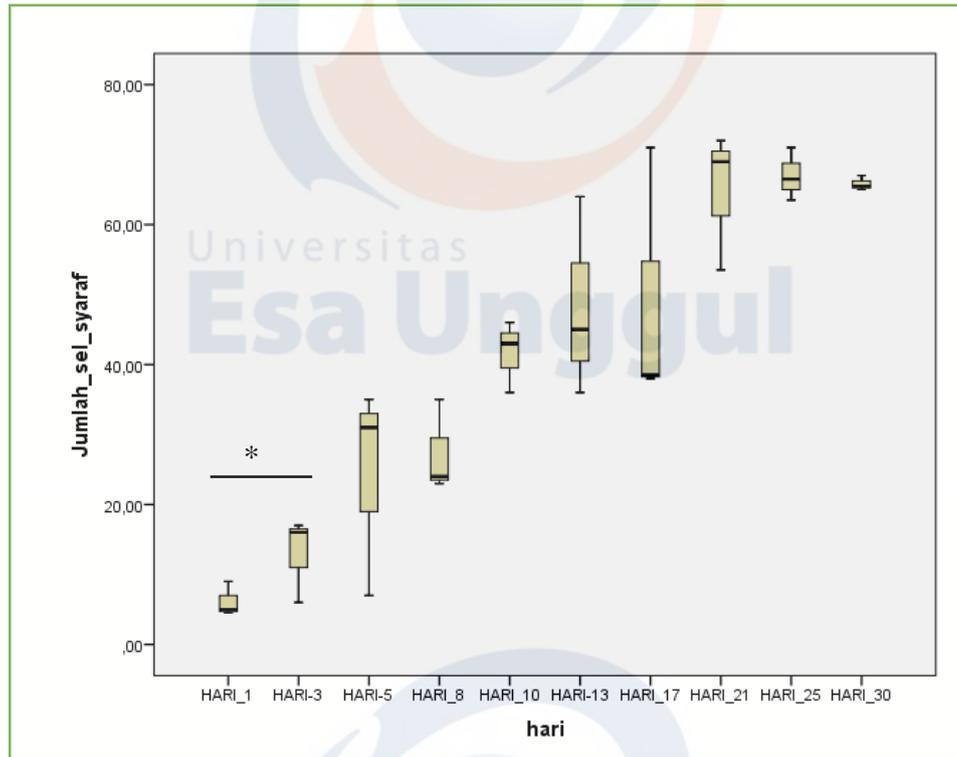
Penghitungan densitas sel mirip fibroblas dan sel saraf ($\text{jumlah}/\text{mm}^2$) dihitung dengan menggunakan perangkat lunak *Image J* pada lima kali bidang pandang pada setiap sediaan.

Hasil penghitungan **densitas sel saraf** disajikan dalam bentuk box plot. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 8 dan hari ke 10 ($p < 0,05$). Meskipun terlihat adanya pertumbuhan densitas sel saraf pada hari lainnya, namun tidak terdapat adanya perbedaan nyata antara hari-hari tersebut (gambar 4.18).



Gambar 4.18 Densitas sel saraf pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30, $n = 30$, uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara hari ke 8 dan 10 ($p < 0,05$)

Hasil penghitungan **densitas sel mirip fibroblas** disajikan dalam bentuk box plot dengan uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara densitas sel pada hari ke 1 dan hari ke 3 ($p < 0,05$). Pada hari lainnya, tampak tidak terdapat adanya perbedaan nyata, namun terlihat adanya pertumbuhan densitas sel tersebut (gambar 4.19).

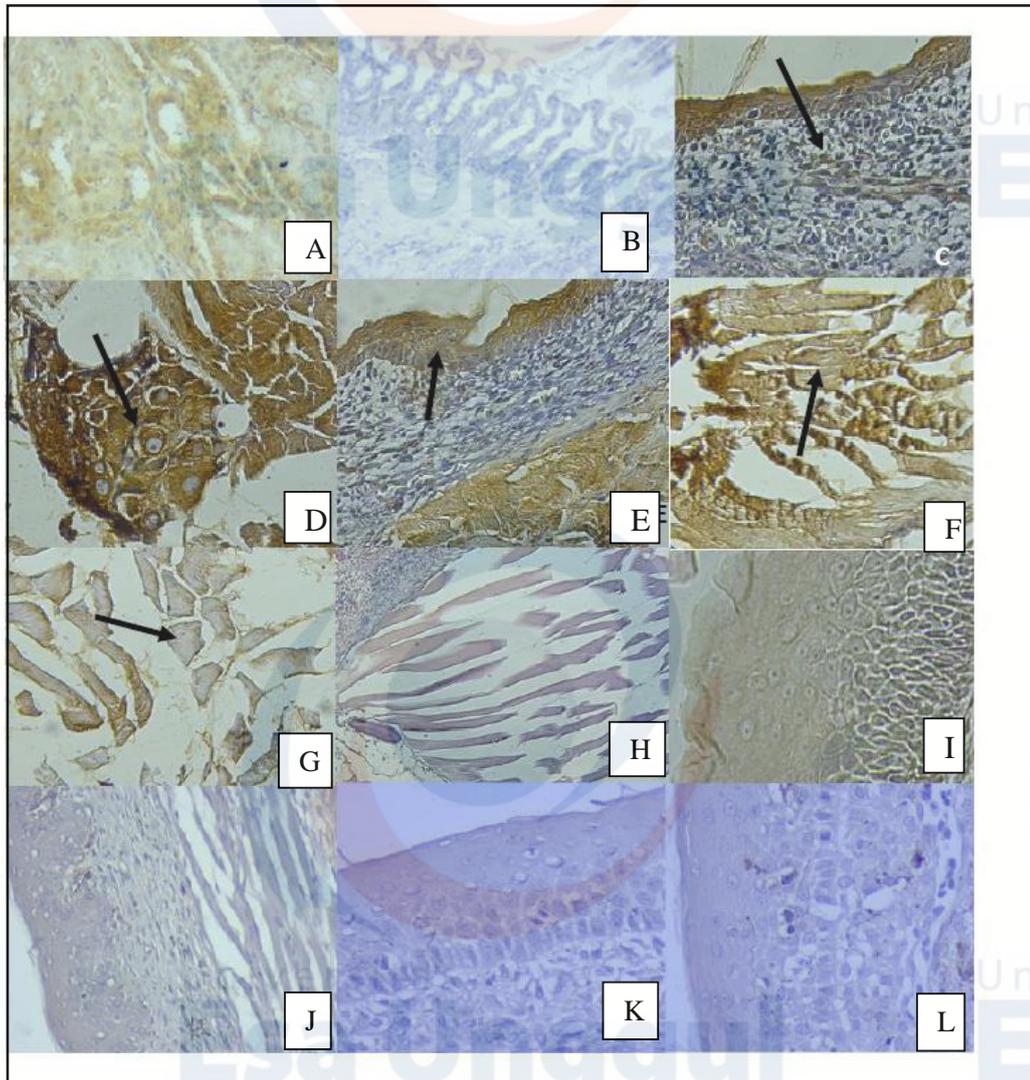


Gambar 4.19 Densitas sel mirip fibroblas pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 30, $n = 30$, uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara hari ke 1 dan 3 ($p < 0,05$)

4.4 Analisis sediaan Imunohistokimia

4.4.1 Protein HIF-1 α

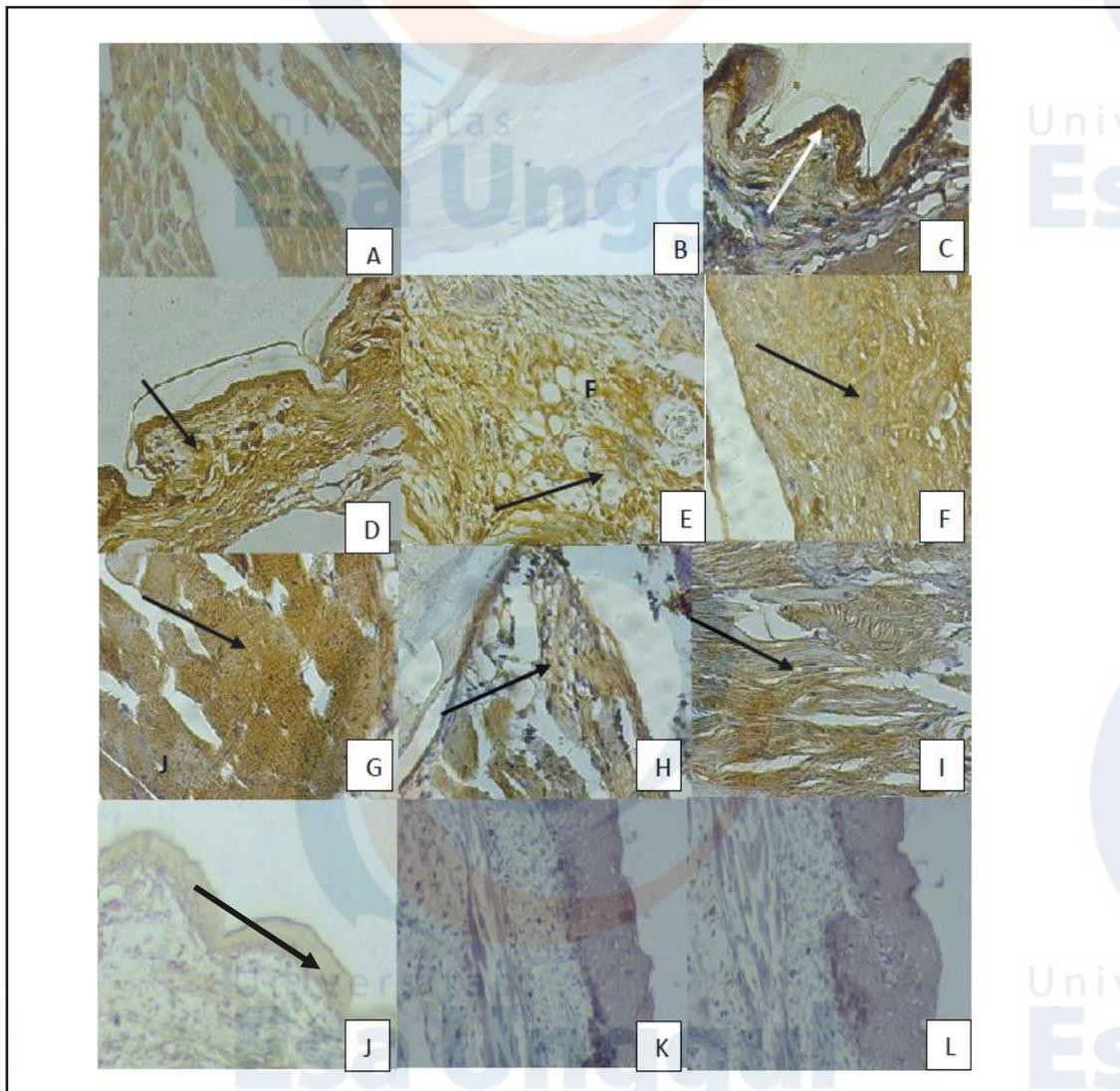
Keberadaan protein HIF-1 α dengan pewarnaan imunohistokimia ditampilkan pada Gambar 4.20, memperlihatkan adanya sebaran protein tersebut pada sel epitel, sel basal lamina, sel mirip fibroblas, sel saraf ganglion, dan sel otot lurik. Pada hari ke 1 sampai ke 8 ekspresi protein tersebut masih tampak jelas, namun pada hari ke 10 dan seterusnya ekspresi protein tersebut mulai tipis dan tidak tampak lagi.



Gambar 4.20 Analisis sediaan imunohistokimia protein HIF-1 α . (A). Kontrol positif pada jaringan glomerulus ginjal mencit; (B). Kontrol negatif; (C). protein HIF-1 α pada sel mirip fibroblas pada hari ke 1; (D). pada hari ke 3, tampak protein HIF-1 α pada sel saraf ganglion; (E). Protein HIF-1 α pada sel basal lamina di hari ke 5; (F). Protein HIF-1 α pada sel otot, preparat di hari ke 8; (G-L) preparat pada hari ke 10; 13; 17; 21; 25; dan 30, tidak ditemukan lagi protein HIF 1 α . Perbesaran sediaan 40 x 10.

4.4.2 Protein HIF-2 α

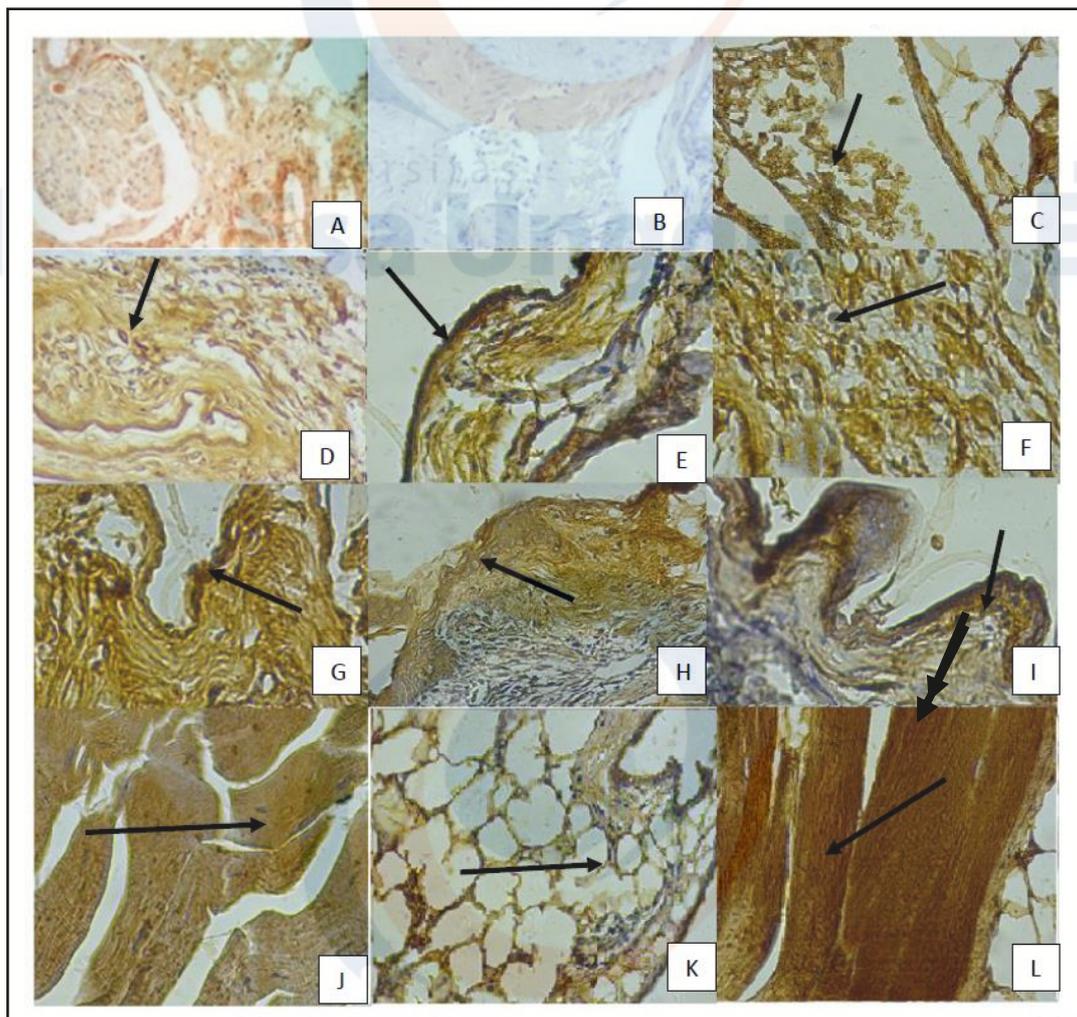
Pada Gambar 4.21, tampak sebaran protein HIF-2 α pada sediaan Imunohistokimia pada sel sel saraf, sel endotel, mesenkim, sel mirip fibroblast, serta pada otot lurik pada hari yang tampak pada hari ke 1; 3; 5; 8; 10; 13; dan ke 17. Namun, pada hari ke 21 sampai ke 30, protein HIF-2 α tampak lebih tipis bahkan tak terlihat.



Gambar 4.21 Analisis sediaan imunohistokimia protein HIF-2 α . (A). Kontrol positif pada jaringan otot jantung mencit; (B). Kontrol negatif; (C) HIF-2 α di sitoplasma sel basal lamina pada hari ke 1; (D) HIF-2 α pada sel saraf tepi hari ke 3; (E). HIF-2 α pada sel endotel hari ke 5; (F) HIF-2 α pada sitoplasma sel mirip fibroblas hari ke 8; (G) pada sel otot lurik hari ke 10; (H) HIF-2 α sitoplasma sel mesenkim hari ke 13; (I) pada sel otot lurik hari ke 17; (J-L) protein HIF-2 α mulai tipis dan tak terlihat. Perbesaran sediaan 40 x 10.

4.4.3 Protein Cygb

Pada sediaan imunohistokimia ditemukan protein Cygb yang tersebar pada beberapa sel mulai dari hari ke 1-30 setelah autotomi (Gambar 4.22). Ekspresi protein Cygb tampak pada sitoplasma dan inti sel basal lamina, sitoplasma sel saraf, sel lemak, sel mirip fibroblas, dan sel otot



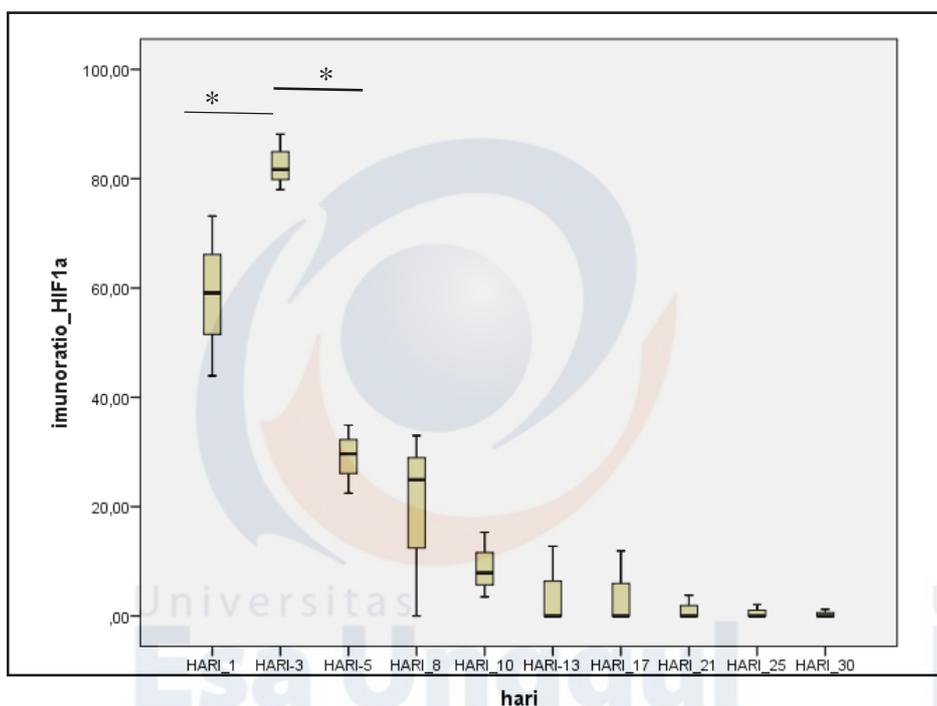
Gambar 4.22 Analisis sediaan imunohistokimia protein Cygb pada regenerasi jaringan ekor cecak dengan pewarnaan imunohistokimia. (A). Kontrol positif menggunakan duodenum mencit; (B) Kontrol negatif; (C) Protein Cygb pada sel leukosit pada hari ke 1; (D) Protein Cygb pada sitoplasma sel saraf pada hari ke 3; (E) Protein Cygb pada membran sel epitel pada hari ke 5; (F) Protein Cygb pada sel mirip fibroblas pada hari ke 8; (G-I) Protein Cygb pada sel epitel pada hari ke 10, 13, dan 17; (J) Protein Cygb pada jaringan otot pada hari ke 21; (K) Protein Cygb pada sel lemak pada hari ke 25; (L) Protein Cygb pada hari ke 30. Perbesaran sediaan 40 x 10.

4.5. Analisis semi kuantitatif *Immunoratio* Hasil Imunohistokimia

Analisis semi kuantitatif protein dengan menggunakan perangkat lunak *Immunoratio* menghasilkan nilai persentase area yang terwarnai DAB *chromagen* (warna coklat) terhadap keseluruhan preparat hasil pewarnaan imunohistokimia. Warna coklat menunjukkan adanya ikatan antara protein dengan antibodi.

4.5.1 Protein HIF-1 α

Hasil penghitungan semi kuantitatif dengan menggunakan perangkat lunak *immunoratio* menghasilkan nilai presentase yang tinggi protein HIF-1 α pada hari ke 1 dan hari ke 3, dan mulai menurun pada hari ke 5, 8 sampai hari ke 17. Nilai presentase tersebut mencapai puncaknya pada hari ke 3. Pada hari ke 8 sampai hari ke 17 protein HIF-1 α masih terdapat pada sediaan walau semakin kecil nilai presentase *immunoratio*nya (Gambar 4.23). Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3, serta antara hari ke 3 dengan hari ke 5.

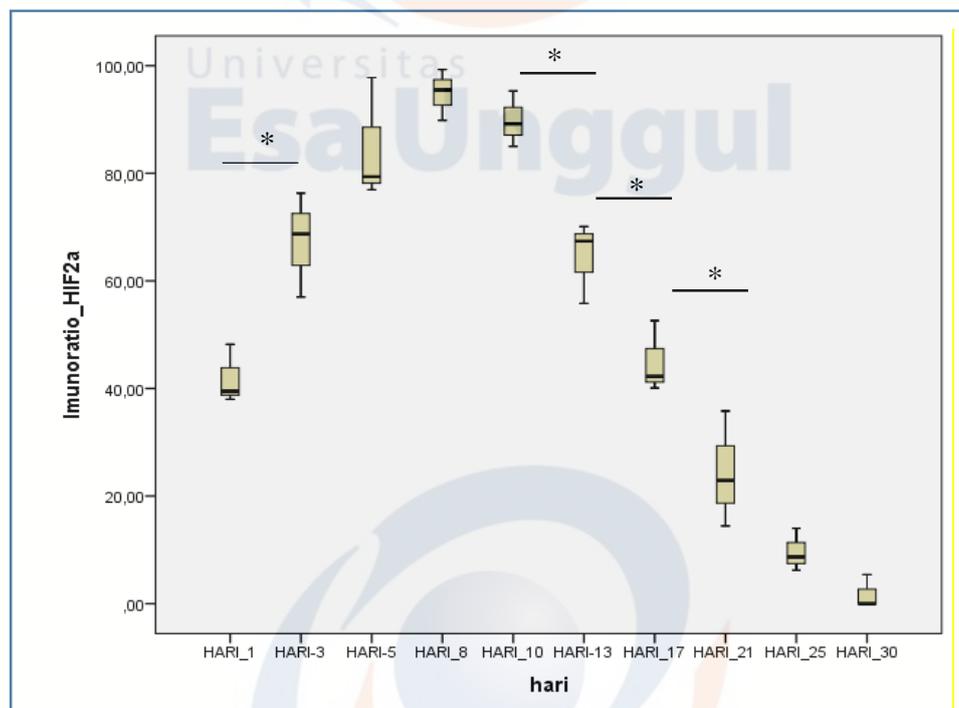


Gambar 4.23 Nilai semi kuantitatif rata-rata presentase *immunoratio* protein HIF-1 α pada sediaan imunohistokimia n =30, Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3 dan hari ke 3 dengan hari ke 5 ($p < 0,05$)

4.5.2 Protein HIF-2 α

Hasil semi kuantitatif hasil *scanning immunoratio* protein HIF-2 α , menghasilkan nilai presentase keberadaan protein HIF-2 α yang tinggi pada hari ke 1 sampai ke 17. Pada hari ke 21 sampai ke 25, keberadaan protein ini masih ditemukan walau sangat kecil nilainya. Nilai presentase protein Cygb mencapai puncaknya pada hari ke 8, dan mulai menurun pada hari ke 10 (Gambar 4.24). Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya

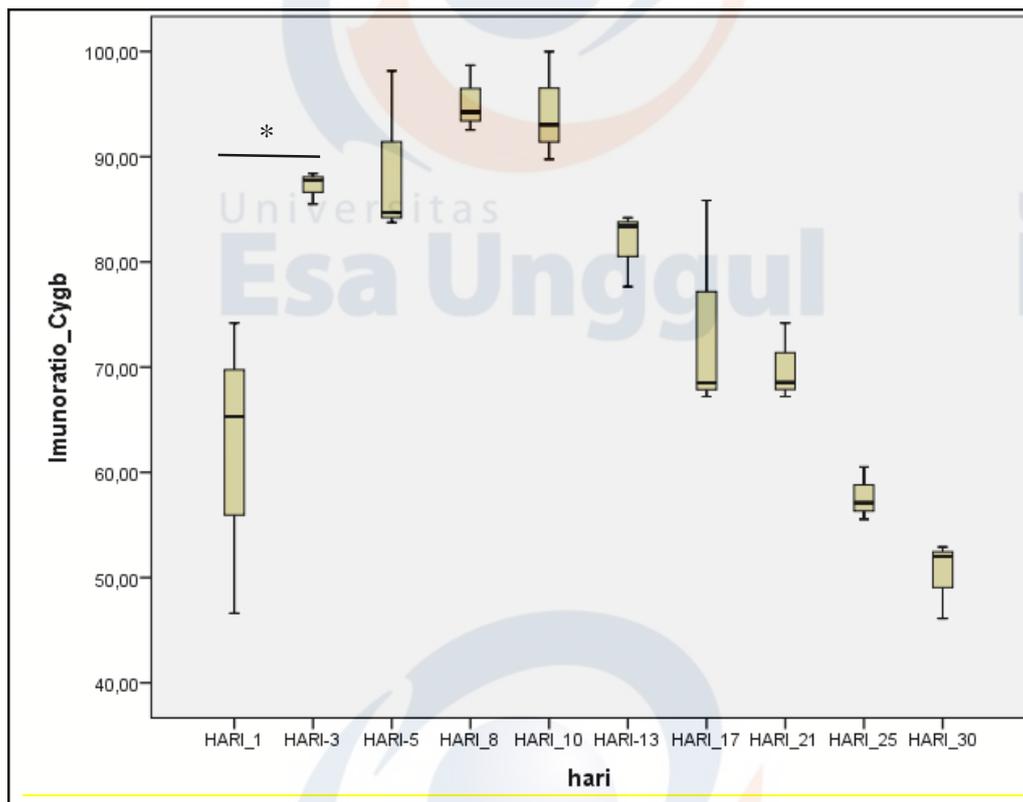
perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3, serta antara hari ke 10 dengan hari ke 13, hari ke 13 dengan hari ke 17, serta hari ke 17 dengan hari ke 21.



Gambar 4.24 Nilai semi kuantitatif rata-rata presentase *immunoratio* protein HIF-1 α pada sediaan imunohistokimia n =30, Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3, hari ke 10 dengan ke 13, antara hari ke 13 dengan 17, serta antara hari ke 17 dengan ke 21 ($p < 0,05$)

4.5.3 Protein Cygb

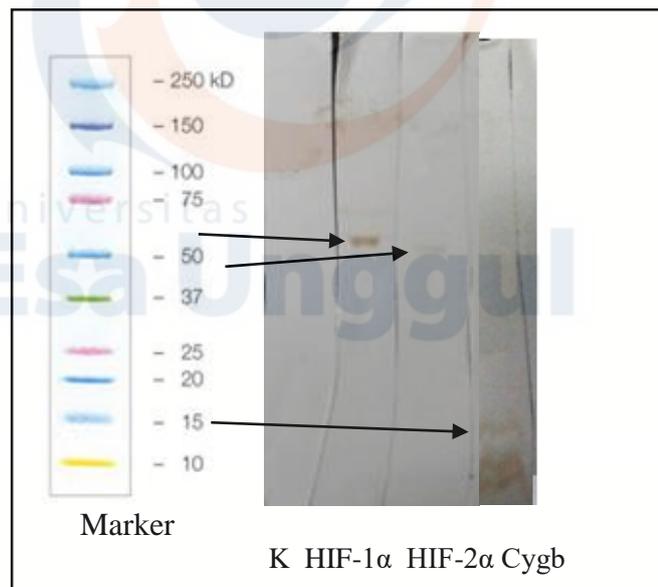
Skor rata-rata presentase protein Cygb dengan perangkat lunak *immunoratio* menunjukkan adanya keberadaan protein yang cukup tinggi pada setiap hari pengamatan dari hari ke 1 sampai hari ke 30, dan mencapai puncaknya pada hari ke 8 dan ke 10. Tampak adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3 (Gambar 4.25).



Gambar 4.25 Nilai semi kuantitatif rata-rata presentase *immunoratio* protein Cygb pada sediaan imunohistokimia $n = 30$, Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3 ($p < 0,05$)

4.6 Analisis Western Blot

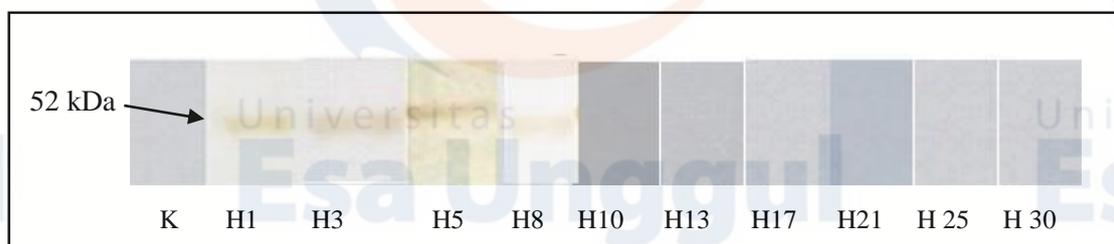
Hasil analisis Western Blot ketiga protein dengan menggunakan marker *Kaleidoscope Prestained Natural Protein Standard* sebagai standard berat protein dengan kisaran berat protein dari 10 kDa-250 kDa, menunjukkan berat protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb, masing-masing memiliki berat sebesar 52 kDa, 50 kDa dan 15 kDa (Gambar 4.26).



Gambar 4.26 Hasil uji Western Blot protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb dengan standard marker *Kaleidoscope* (10-250 kDa), pada masing-masing 52 kDa; 50 kDa; dan Cygb 15 kDa.

4.6.1. Protein HIF-1 α

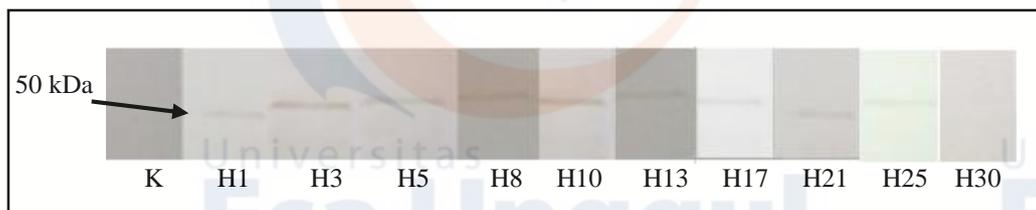
Hasil analisis Western Blot protein HIF-1 α menunjukkan bahwa protein HIF-1 α diekspresikan pada hari ke-1 sampai hari ke-8, walapun mulai tipis pitanya. Pada hari ke-10 dan seterusnya tidak tampak lagi protein tersebut (Gambar 4.27).



Gambar 4.27 Protein HIF-1 α hasil uji Western Blot dengan berat protein 52 kDa. Pita protein tampak pada hari ke 1 sampai hari ke 8, dengan K sebagai kontrol negatif. Pada hari ke 8-30 pita protein sudah tidak tampak lagi

4.6.2 Protein HIF-2 α

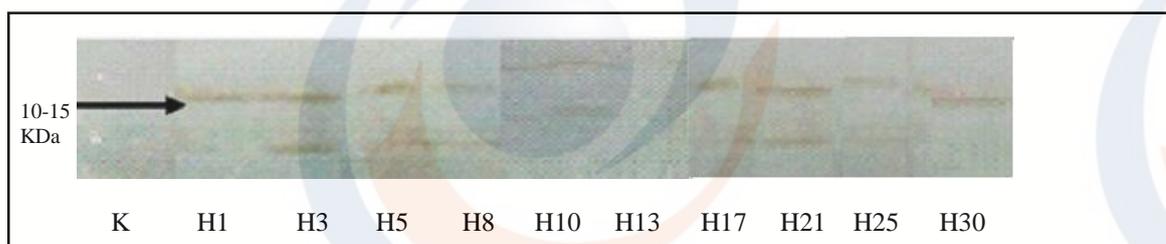
Analisis protein HIF-2 α dengan uji Western Blot menunjukkan adanya protein tersebut pada hari ke-1 sampai hari ke-25, walau pita protein pada hari ke-13 sampai hari ke 25 tampak sangat tipis (Gambar 4.28).



Gambar 4.28 Protein HIF-2 α hasil uji Western Blot dengan berat protein 50 kDa.
Pita protein tampak pada hari ke 1 sampai hari ke 25, dengan K sebagai kontrol negatif. Pada hari ke 13 sampai hari ke 25 pita protein sangat tipis dan tidak tampak lagi pada hari ke 30.

4.6.3 Protein Cygb

Analisis Western Blot untuk protein Cygb menunjukkan adanya pita protein Cygb dengan berat protein 10-15 kDa pada mulai hari ke-1 sampai hari ke-30, dengan pita yang tebal (Gambar 4.29).



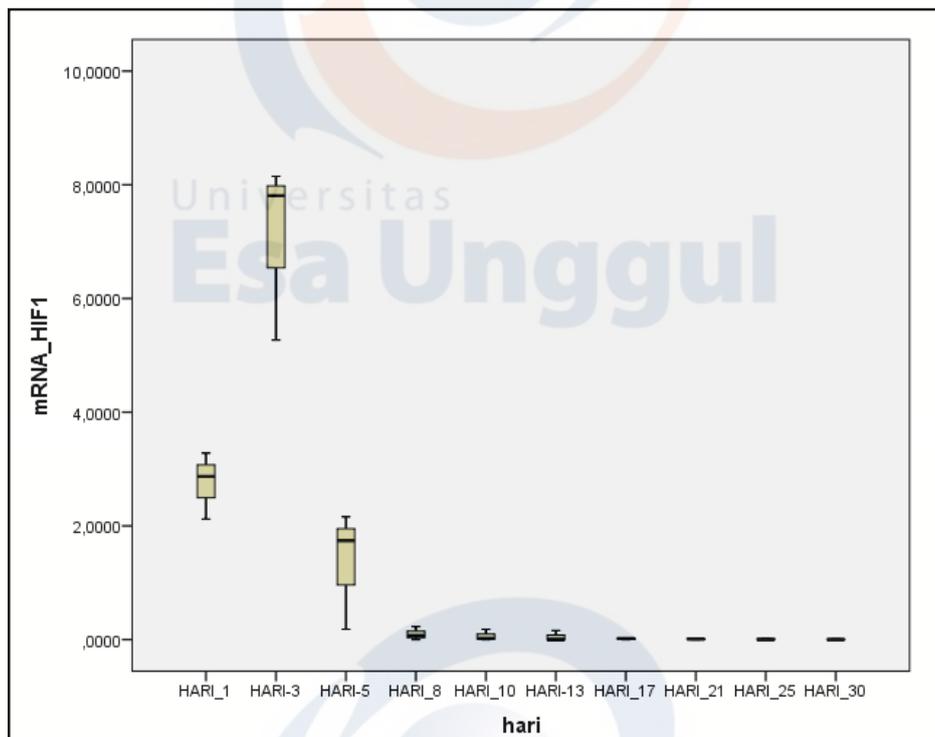
Gambar 4.29. Protein Cygb hasil uji Western Blot dengan berat protein 10-15 kDa, dibandingkan dengan kontrol negatif (K).

Pita protein tampak masih tebal pada hari ke 1 sampai hari ke 30

4.7. Analisis Ekspresi mRNA

4.7.1. Ekspresi relatif mRNA HIF-1 α

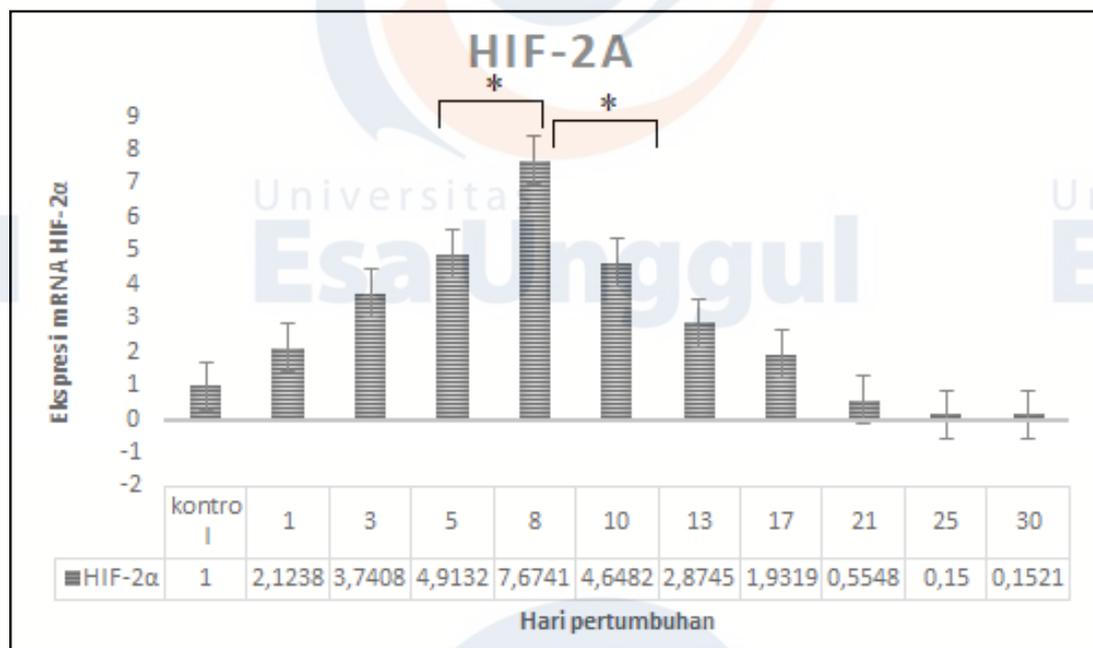
Hasil uji qRT-PCR menunjukkan adanya ekspresi mRNA HIF-1 α relatif terhadap kontrol, pada hari ke 1 sampai hari ke 30 menunjukkan ekspresi yang tinggi pada hari ke 1 sampai hari ke 5. Ekspresi mencapai puncaknya pada hari ke 3, dan menurun secara progresif pada hari ke-5 sampai hari ke-30. Hasil uji distribusi data menunjukkan hasil distribusi data tidak normal dan uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada hari ke 1 dengan hari ke 3 serta antara hari ke 3 dengan hari ke 5 ($p < 0,05$) (Gambar 4.30).



Gambar 4.30 Ekspresi mRNA HIF-1 α relatif terhadap kontrol (K) dari hari ke-1 sampai hari ke-30. $n = 30$, Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada hari ke 1 dengan hari ke 3 dan antara hari ke 3 dengan hari ke 5, $p < 0,05$.

4.7.2 Ekspresi relatif mRNA HIF-2 α

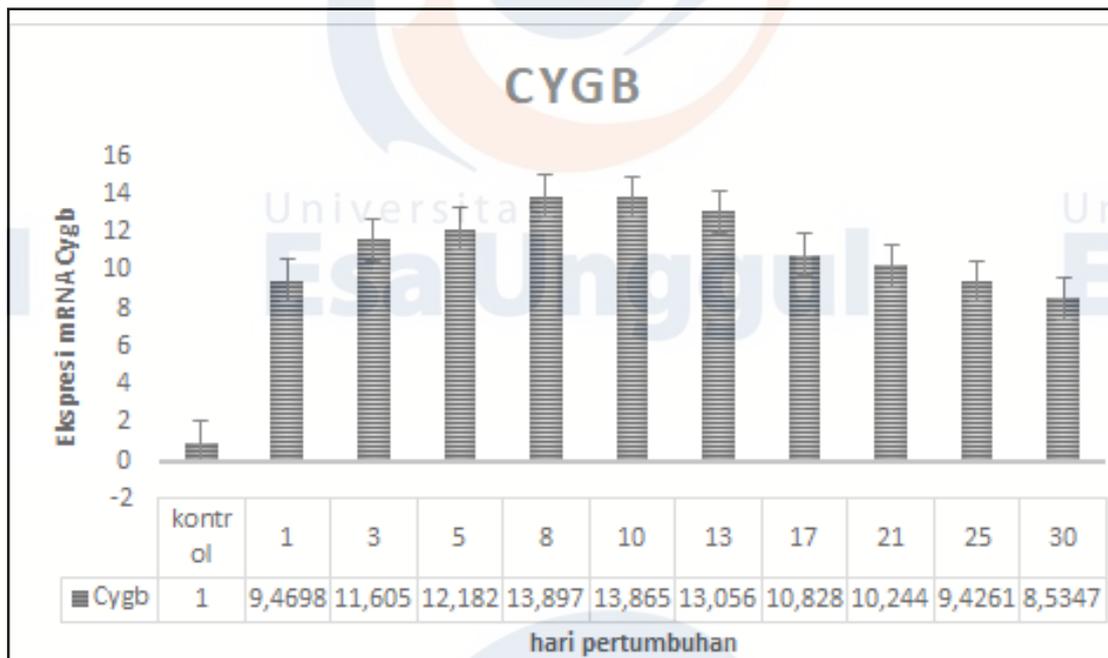
Data ekspresi mRNA HIF-2 α berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$). Data ekspresi mRNA HIF-2 α regenerasi jaringan ekor cecak, pada hari ke 1-17 relatif lebih tinggi dibandingkan kontrol, dan mencapai puncaknya pada hari ke-8 (Gambar 4.31). Uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara hari ke 5 dan hari ke 8 serta anatar hari ke 8 dengan hari ke 10, menunjukkan adanya penurunan secara nyata dari mulai hari ke 10.



Gambar 4.31 Ekspresi relatif mRNA HIF-2 α terhadap kontrol (K) dari hari ke 1-30. $n=30$, sebaran data normal ($p > 0,05$) dan dengan uji ANOVA terdapat perbedaan bermakna ekspresi mRNA HIF-2 α antara hari ke 5 dengan hari ke 8 serta antara hari ke 8 dengan hari ke 10, $p < 0,05$.

4.7.3. Ekspresi relatif mRNA Cygb

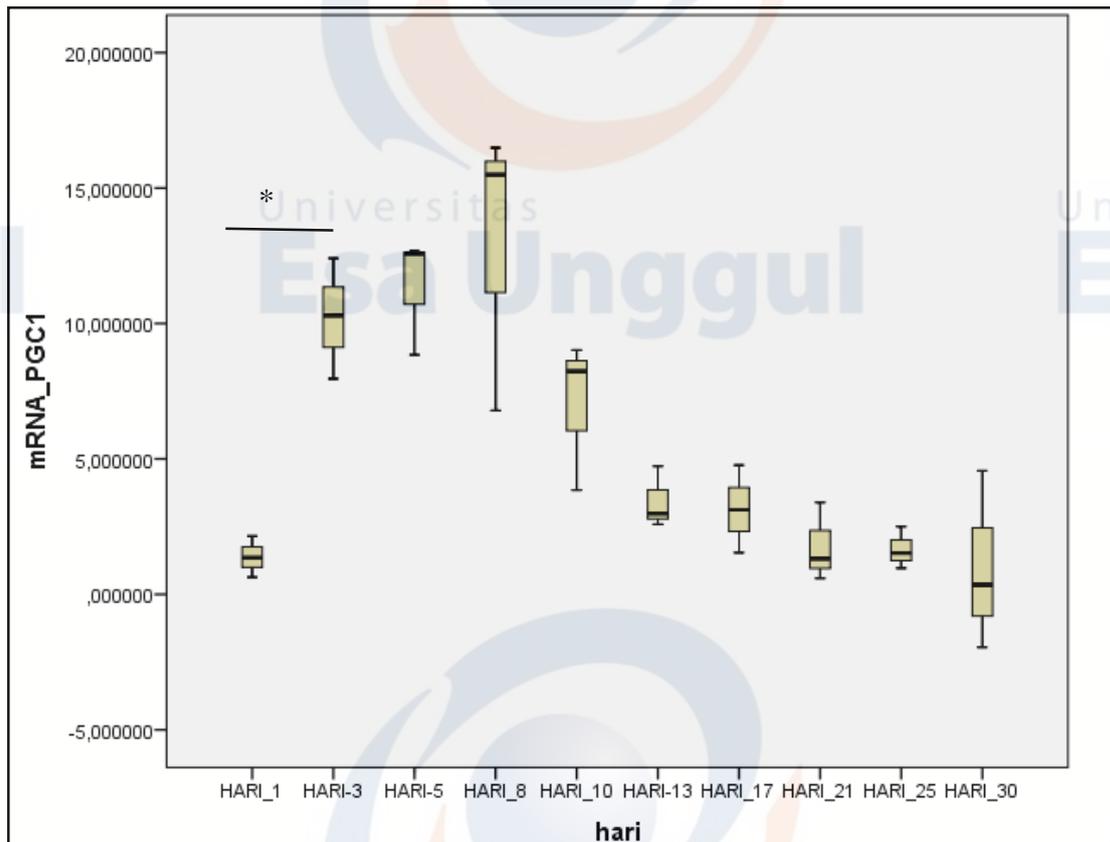
Analisis ekspresi mRNA Cygb ditampilkan pada Gambar 4.32. Sebaran data ekspresi mRNA Cygb berdistribusi normal dan homogen dengan nilai $p > 0,05$. Ekspresi mRNA Cygb jauh lebih tinggi mulai hari ke-1 sampai hari ke-30 proses regenerasi jaringan dibandingkan kottrol. Ekspresi mRNA Cygb mencapai puncaknya pada hari-8 dan hari ke-10, namun hasil uji ANOVA tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari pengamatan ($p > 0,05$), walaupun data pengamatan menunjukkan adanya perbedaan ekspresi mRNA Cygb.



Gambar 4.32. Ekspresi relatif mRNA *Cygb* terhadap kontrol (K) mulai dari hari ke-1 sampai hari-30. $n = 30$, sebaran data normal ($p > 0,05$), namun hasil uji ANOVA tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara setiap hari pengamatan.

4.7.4 Ekspresi relatif mRNA PGC-1 α

Analisis ekspresi mRNA PGC-1 α ditampilkan pada Gambar 4.33. Ekspresi mRNA PGC-1 α pada hari pertama relatif di bawah kontrol. Ekspresinya naik secara tajam pada hari ke-3 dan hari ke-5, dan mulai menurun secara progresif pada hari ke-8 sampai hari ke-30. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dan hari ke 3 ($p < 0,05$). Ekspresi mRNA pada hari ke-13 sampai hari ke-30 relatif sama dengan kontrol.

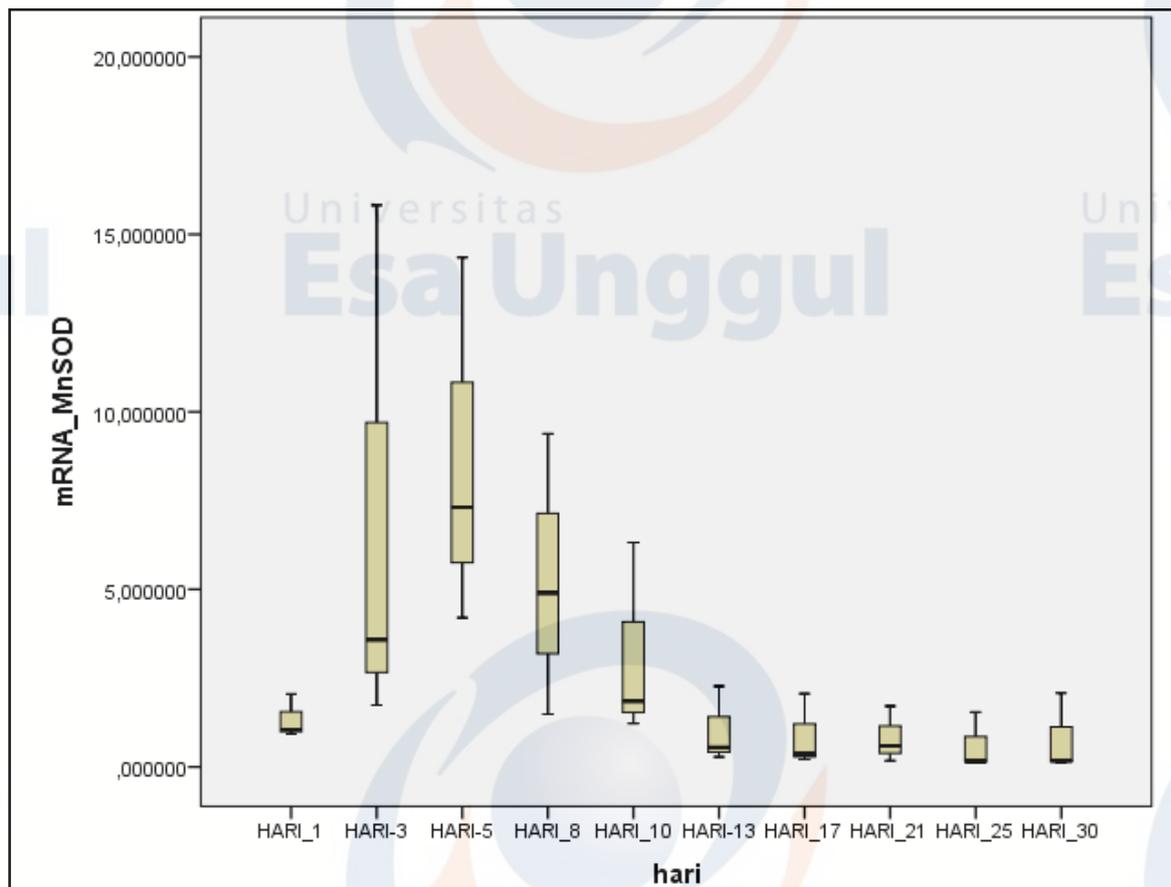


Gambar 4.33 Ekspresi relatif mRNA PGC-1 α terhadap kontrol (K) mulai dari hari ke-1 sampai hari-30

n =30, Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dan hari ke 3. $p < 0,05$.

4.7.5 Ekspresi relatif mRNA MnSOD

Ekspresi relatif mRNA MnSOD pada hari ke-1 sampai ke-30 ditampilkan pada Gambar 4.34. Ekspresi mRNA pada hari ke-1 dan ke-3 relatif sama dengan kontrol, dan mencapai puncaknya hari ke-5 dan ke-8. Pada hari berikutnya terjadi penurunan secara progresif sampai hari ke-30, walaupun hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ekspresi mRNA MnSOD pada setiap hari pengamatan ($p > 0,05$).



Gambar 4.34 Ekspresi relatif mRNA MnSOD terhadap kontrol (K) mulai dari hari ke-1 sampai hari-30.

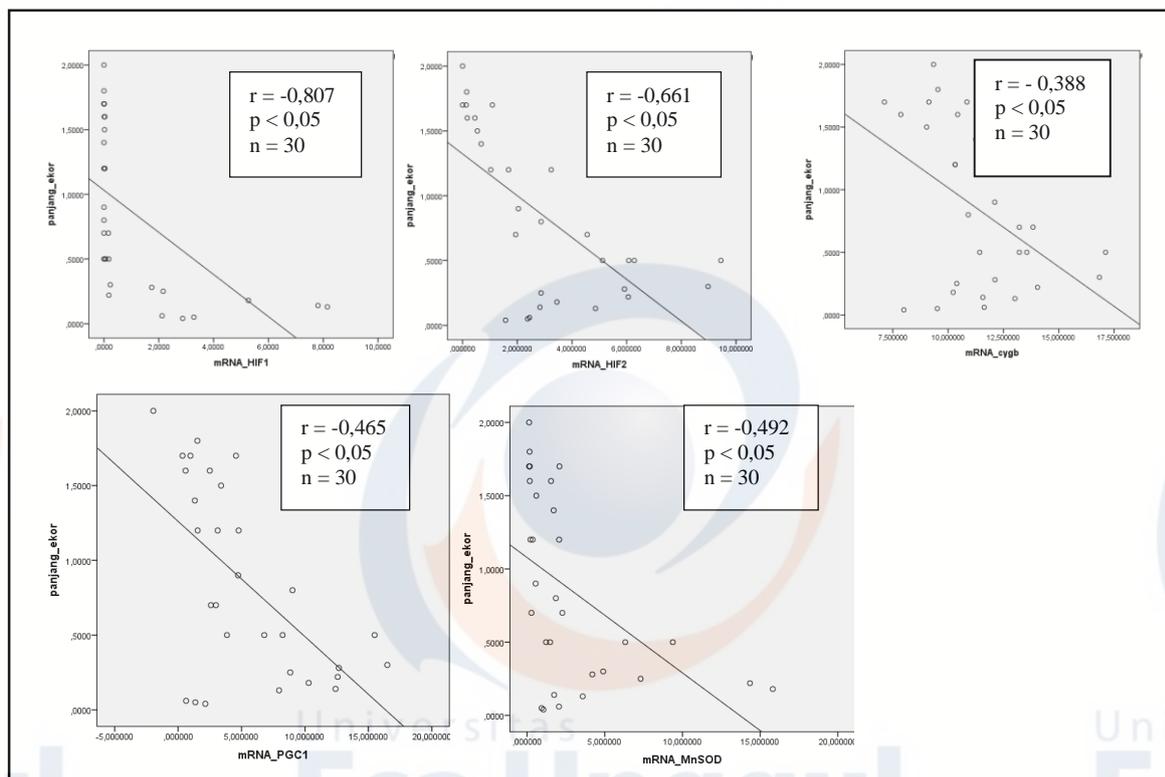
n =30, Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan tidak adanya perbedaan nyata pada setiap pengamatan ($p > 0,05$).

4.8 Korelasi antar variabel

4.8.1 Korelasi antara mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD dengan panjang ekor

Masing-masing korelasi antara ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD dengan pertumbuhan panjang ekor, ditampilkan pada Gambar 4.35, yang masing-masing berkorelasi secara nyata ($p < 0,05$) dengan masing-masing semua nilai korelasi (r) bersifat negatif. Hal tersebut menunjukkan adanya stimulasi ekspresi gen tersebut terhadap pertumbuhan panjang ekor cecak, pada saat ekspresi tinggi panjang ekor cecak belum menunjukkan pertumbuhan panjang yang signifikan. Saat gen tersebut telah menstimulasi pertumbuhan gen, maka ekspresi ke 5 ge tersebut menurun. Dari ke 5 gen tersebut yang memiliki nilai korelasi negatif sangat kuat dan bermakna dengan pertumbuhan panjang ekor adalah mRNA HIF-1 α ($r = -0.87$), sedangkan variabel mRNA

lainnya berkorelasi negatif kuat dan lemah. Nilai korelasi dengan mRNA HIF-2 α ($r = -0,661$) bersifat kuat dan bermakna, nilai korelasi dengan mRNA Cygb lemah dan bermakna ($r = -0,388$), dengan mRNA PGC-1 α ($r = -0,465$) korelasinya sedang dan bermakna, dan korelasi dengan mRNA MnSOD bersifat sedang dan bermakna ($r = -0,492$).

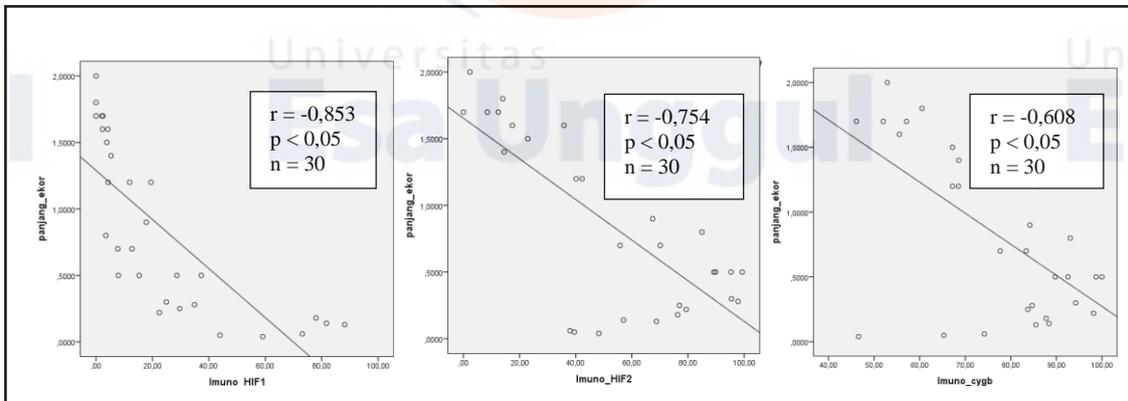


Gambar 4.35 Korelasi antara ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , MnSOD dengan pertumbuhan panjang ekor cecak. Hasil uji korelasi parametrik dan non parametrik, terjadi korelasi nyata dengan $p < 0,05$

4.8.2 Korelasi antara nilai semi kuantitatif presentase *immunoratio* protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb dengan pertumbuhan panjang ekor cecak

Korelasi antara presentase *immunoratio* protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan protein Cygb dengan pertumbuhan panjang ekor cecak, ditampilkan pada gambar 4.36, dengan sifat korelasi nyata ($p < 0,05$) dan sifat korelasi (r) negatif. Hal tersebut menunjukkan adanya stimulasi protein tersebut terhadap pertumbuhan panjang ekor cecak, pada saat protein telah menstimulasi pertumbuhan panjang ekor maka ekspresinya menurun dan ekor cecak tumbuh memanjang. Protein yang memiliki nilai korelasi negatif sangat kuat dan bermakna dengan pertumbuhan panjang ekor cecak adalah HIF-1 α , sedangkan HIF-

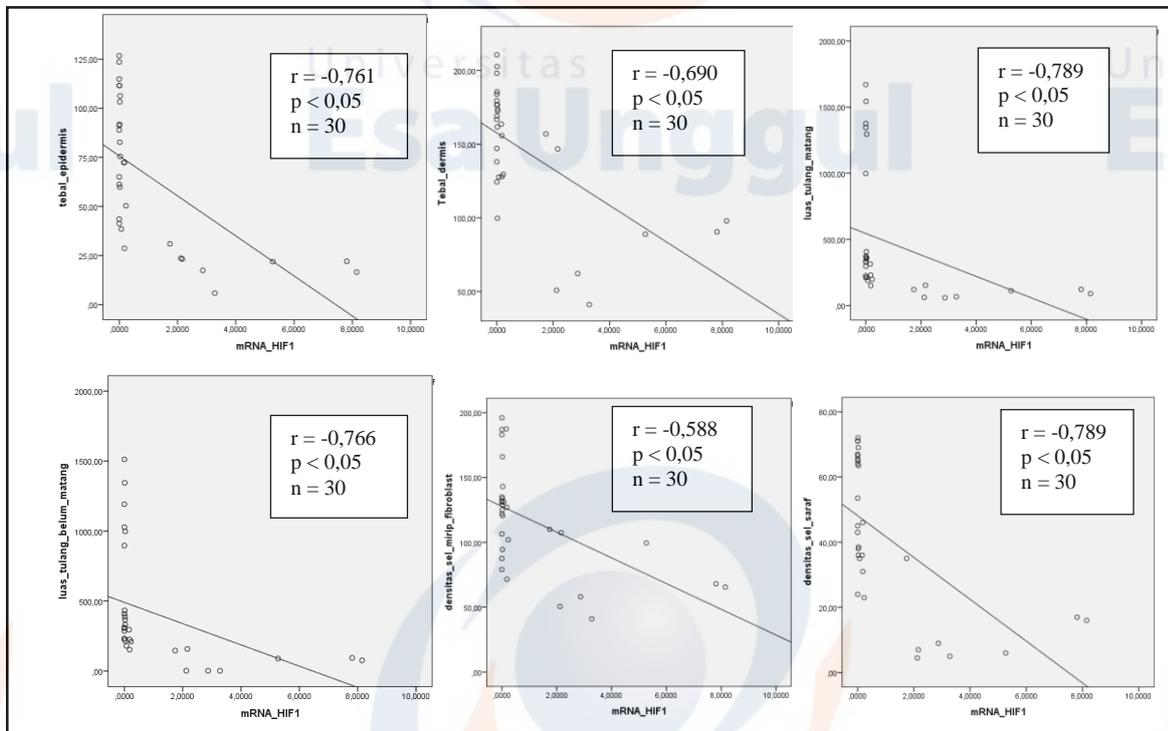
2 α dan Cygb berkorelasi negatif kuat dan bermakna dengan pertumbuhan panjang ekor cecek.



Gambar 4.36 Korelasi antara nilai semi kuantitatif presentase *immunoratio* protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb dengan pertumbuhan panjang ekor cecek.
Nilai korelasi (r) negatif dan bermakna dengan nilai $p < 0,05$

4.8.3 Korelasi mRNA HIF-1 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecek

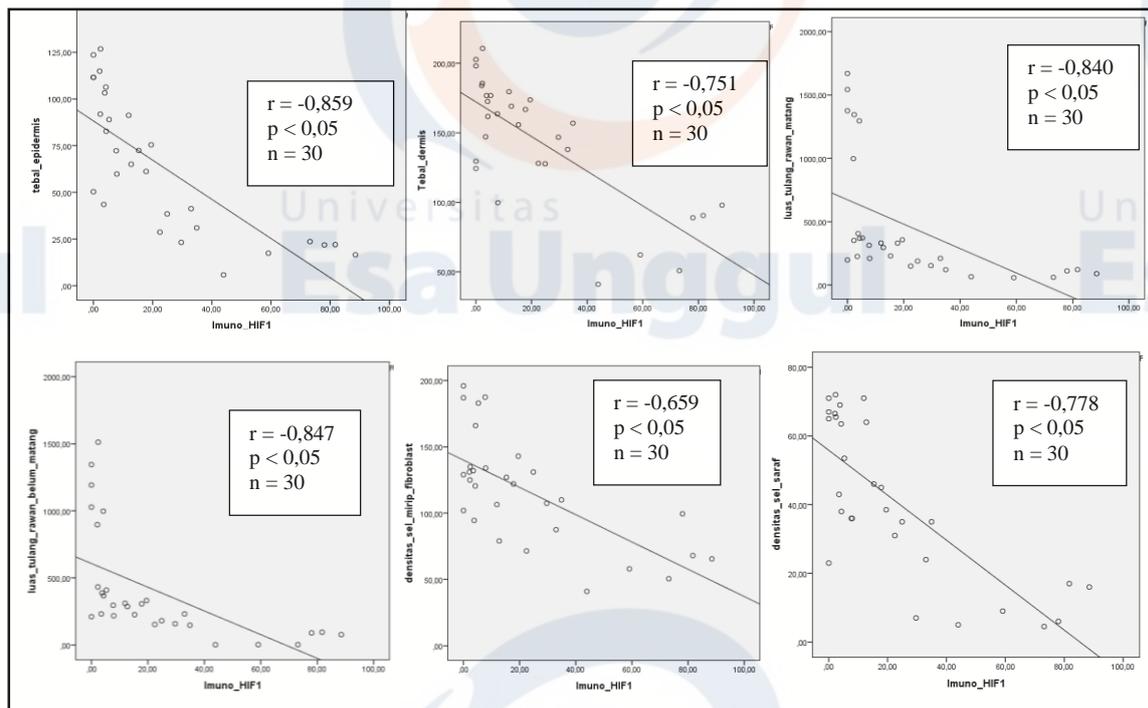
Pada Gambar 4.37, tampak korelasi mRNA HIF-1 α dengan berbagai variabel kuantitas histologi, yang meliputi ketebalan epidermis, ketebalan dermis, luas jaringan tulang rawan matang, luas jaringan tulang rawan belum matang, densitas sel mirip fibroblas, serta densitas sel saraf. Korelasi negatif kuat terjadi dengan semua variabel pada penghitungan kuantitas histologi jaringan ekor cecek yang meliputi, ketebalan epidermis, ketebalan dermis, luas jaringan tulang rawan matang, luas jaringan tulang rawan belum matang, densitas sel saraf, kecuali dengan variabel densitas sel mirip fibroblas yang bersifat korelasi negatif sedang. Korelasi negatif ini menunjukkan adanya stimulasi mRNA HIF-1 α terhadap nilai kuantitatif histologi jaringan ekor cecek, sehingga setelah mRNA HIF-1 α berhasil menstimulasi proses regenerasi jaringan ekor cecek, maka ekspresinya menurun.



Gambar 4.37 Korelasi antara mRNA HIF 1- α dengan tebal epidermis, tebal dermis, luas tulang rawan matang, luas tulang rawan belum matang, densitas sel saraf, serta densitas sel mirip fibroblast. Uji non parametrik dengan nilai $p < 0,05$

4.8.4 Korelasi antara nilai semi kuantitatif presentase protein HIF-1 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecak

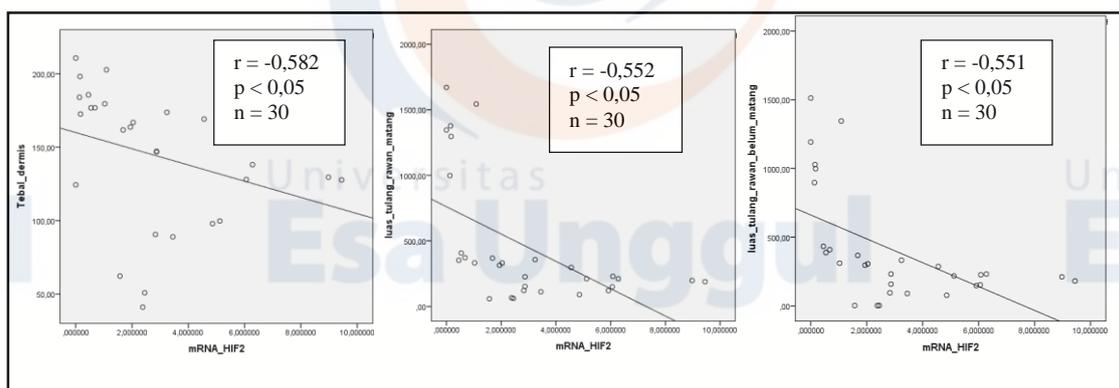
Korelasi antara proporsi protein HIF-1 α dengan variabel kuantitas histologi pada gambar 4.38 tampak sifat korelasinya negatif sangat kuat dan bermakna, antara protein HIF-1 α dengan ketebalan epidermis, luas jaringan tulang rawan matang, luas jaringan tulang rawan belum matang, dan densitas sel saraf. Sedangkan korelasi negatif kuat dan bermakna terjadi antara protein HIF-1 α dengan ketebalan dermis dan densitas sel mirip fibroblas. Korelasi negatif ini menunjukkan korelasi yang berbanding terbalik, pada hari-hari pertama pertumbuhan ekor cecak ekspresi HIF-1 α tinggi, terjadi stimulasi pertumbuhan sel pada jaringan ekor. Saat stimulasi tersebut berhasil, maka pertumbuhan jaringan sel pada ekor cecak semakin meningkat dan ekspresi HIF-1 α menurun.



Gambar 4.38 Korelasi presentase protein HIF-1 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak dengan uji non parametrik dan berkorelasi nyata $p < 0,05$

4.8.5 Korelasi antara mRNA HIF-2 α dengan kuantitas histologi jaringan ekor cecak

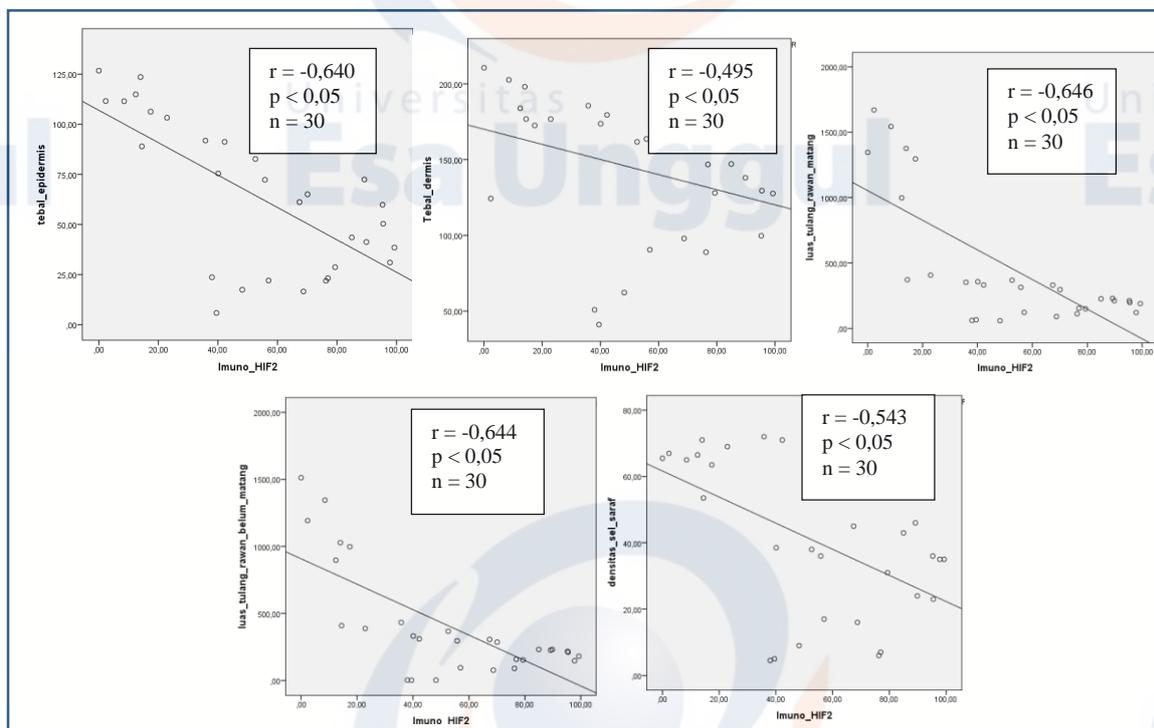
Korelasi yang terjadi antara mRNA HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak memiliki nilai korelasi negatif sedang. Variabel yang berkorelasi adalah ketebalan epidermis, luas jaringan tulang rawan matang, luas jaringan tulang rawan belum matang, sedangkan variabel histologi lainnya tidak berkorelasi dengan variabel mRNA HIF-2 α . Uji korelasi dilakukan secara parametrik dan non parametrik yang menghasilkan nilai $p < 0,05$ korelasi bermakna (gambar 4.39). Korelasi negatif sedang mRNA HIF-2 α menunjukkan adanya stimulasi oleh mRNA terhadap peningkatan nilai kuantitatif histologi regenerasi jaringan, saat mRNA telah menstimulasi proses regenerasi jaringan maka nilai kuantitatif histologi semakin tinggi.



Gambar 4.39 Korelasi antara mRNA HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak, uji parametrik dan non parametrik ($p < 0,05$).

4.8.6 Korelasi antara semi kuantitatif presentase protein HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak

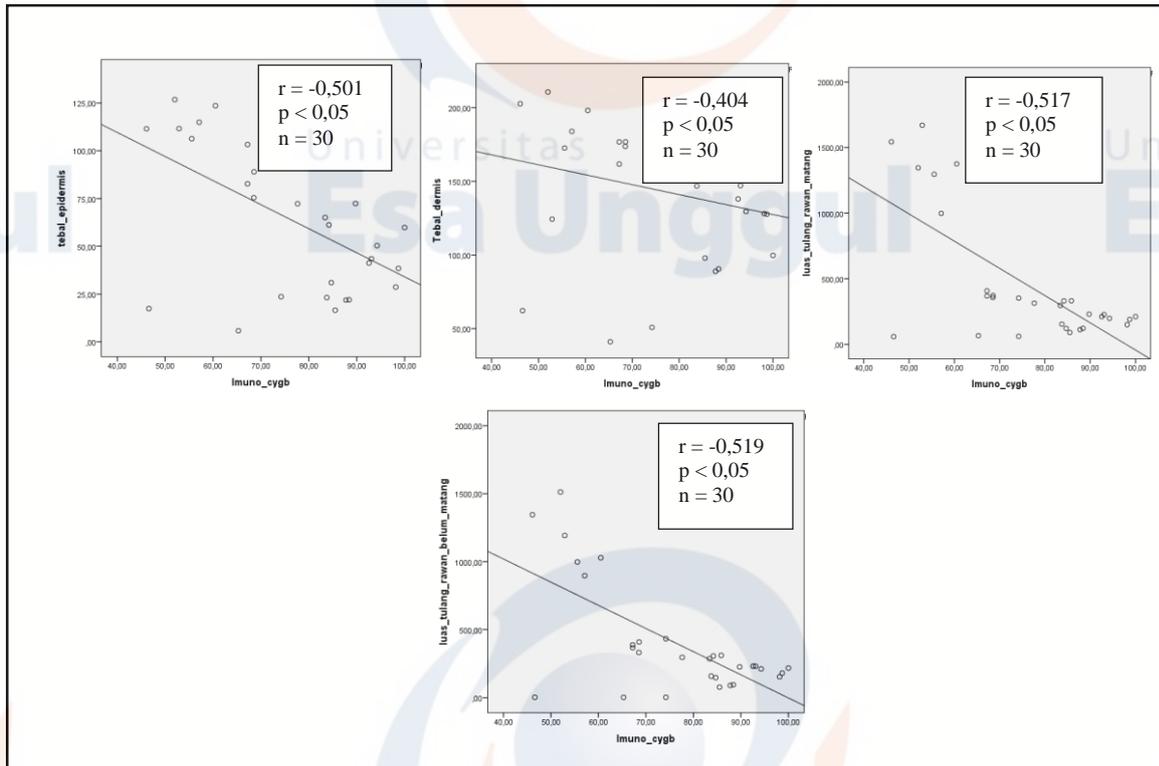
Korelasi yang terjadi antara variabel presentase protein HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak, menghasilkan nilai korelasi negatif sedang dan lemah (Gambar 4.40). Korelasi negatif sedang terjadi antara variabel protein HIF-2 α dengan variabel tebal epidermis, tebal dermis, luas jaringan tulang rawan matang, luas jaringan tulang rawan belum matang, dan densitas sel saraf. Variabel densitas sel mirip fibroblas tidak memiliki korelasi dengan protein HIF-2 α . Uji korelasi dilakukan dengan menggunakan uji parametrik dan non parametrik dengan nilai $p < 0,05$, korelasi bermakna. Uji korelasi negatif menunjukkan adanya stimulasi protein HIF-2 α terhadap nilai kuantitatif histologi, yang menyebabkan nilai kuantitatif histologi menjadi tinggi, dan HIF-2 α menurun.



Gambar 4.40 Korelasi antara presentase protein HIF-2 α dengan variabel kuantitatif histologi jaringan ekor cecak, dengan uji parametrik dan non parametrik, nilai $p < 0,05$

4.8.7 Korelasi antara nilai semi kuantitatif presentase *immunoratio* protein Cygb dengan kuantitatif histologi jaringan ekor cecak

Korelasi antara presentase protein hasil *scanning Immunoratio* Cygb, berbeda nyata dan memiliki nilai korelasi negatif kuat dan sedang secara bermakna ($p < 0,05$). Korelasi kuat terjadi antara protein Cygb dengan variabel ketebalan epidermis, sedangkan korelasi sedang terjadi antara protein Cygb dengan ketebalan dermis, luas tulang rawan matang dan luas tulang rawan belum matang (Gambar 4.41). Namun dengan variabel densitas sel saraf dan densitas sel mirip fibroblas tidak terjadi korelasi yang bermakna. Korelasi negatif menunjukkan bahwa tingginya protein Cygb akan menstimulasi peningkatan kuantitatif histologi jaringan ekor cecak sehingga terjadi peningkatan nilai kuantitatif histologi.



Gambar 4.41 Korelasi antara variabel presentase protein Cygb dengan variabel histologi jaringan ekor cecak, terjadi korelasi bermakna ($p < 0,05$), uji non parametrik yang bersifat negatif kuat dan sedang

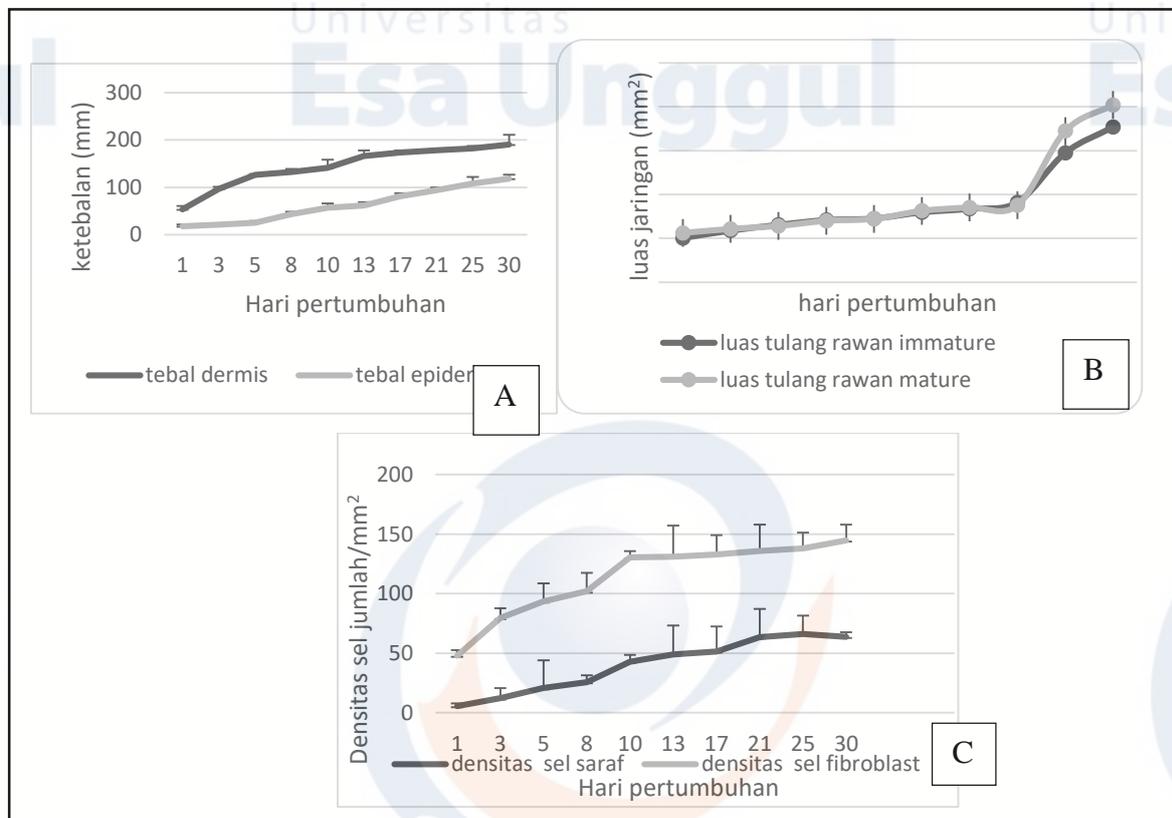
4.9 RANGKUMAN HASIL PENELITIAN

4.9.1 Analisis perbandingan kurva pertumbuhan semi kuantitatif histologi pada regenerasi jaringan ekor cecak

Pada gambar 4.42 tampak perbandingan kurva pertumbuhan ketebalan epidermis dan dermis, perbandingan kurva luas jaringan tulang rawan matang dan tulang rawan belum matang, serta perbandingan kurva densitas sel mirip fibroblas dan sel saraf pada setiap hari pertumbuhan regenerasi jaringan ekor cecak.

Pola kurva antara ketebalan epidermis dan dermis dengan kurva densitas sel mirip fibroblas dan sel saraf, tampak menunjukkan kemiripan pola kurva. Pada hari ke 8 sampai 13, ke 4 kurva mengalami kenaikan yang berbeda nyata, kecuali ketebalan dermis yang telah meningkat sejak hari pertama. Setelah hari ke 13, terjadi kenaikan yang sangat lambat, kecuali sel saraf pada hari ke 30 sedikit menurun.

Berbeda halnya dengan kurva luas tulang rawan matang dan belum matang, keduanya meningkat sangat lambat pada hari ke 1 sampai 21, namun meningkat tajam setelah hari ke 21 sampai hari ke 25.



Gambar 4.42 Kurva perbandingan data kuantitatif histologi pertumbuhan ekor cecak pada pengamatan hari ke 1; 3; 5; 7; 10; 13; 17; 21; 25; dan hari ke 30.

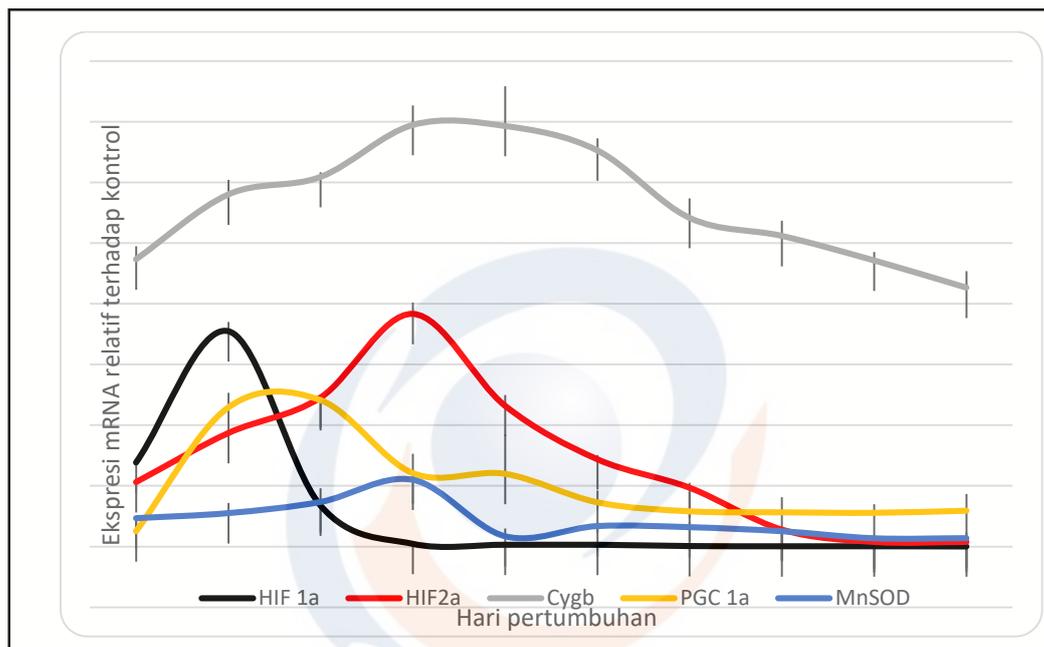
(A) pertumbuhan rata-rata ketebalan epidermis dan dermis (mm); (B) rata-rata luas tulang rawan belum matang dan matang (mm²); (C) rata-rata densitas sel mirip fibroblas dan sel saraf (jumlah/mm²).

4.9.2 Perbandingan keseluruhan ekspresi mRNA dan protein

Perbandingan ekspresi mRNA gen HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD ditampilkan pada grafik gambar 4.43 dari hari ke 1 sampai ke 30. Tampak ekspresi mRNA Cygb relatif tinggi dan lebih lama ekspresinya dibandingkan ke 4 gen lainnya. Puncak ekspresi mRNA relatif berbeda, namun secara keseluruhan ekspresi gen mulai meningkat pada hari ke 3 setelah autotomi ekor cecak.

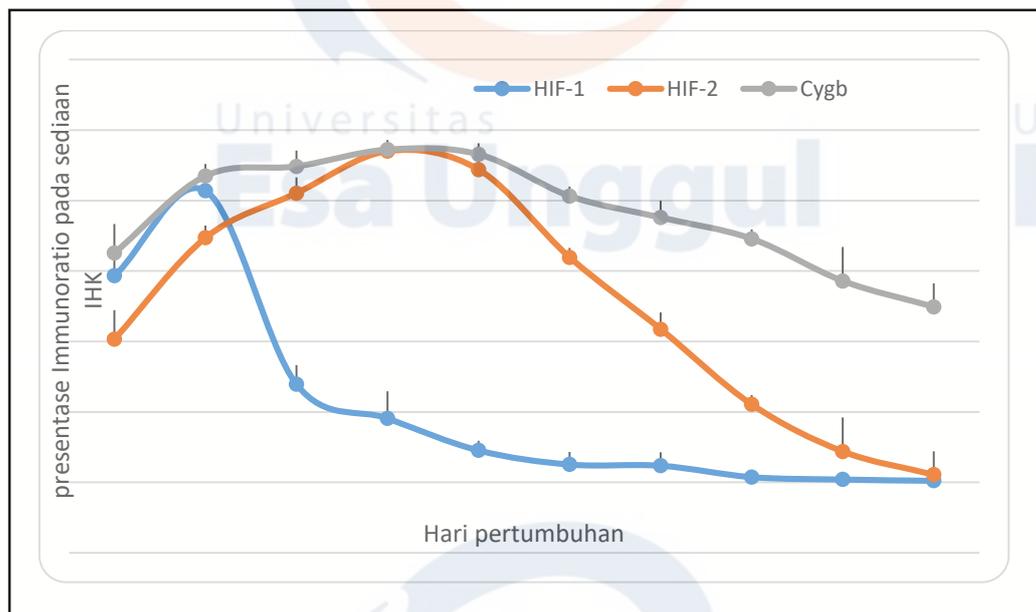
Pada hari pertama, nilai ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , dan PGC-1 α , tidak ada perbedaan nyata pada nilai median, minimum dan maksimum. Ekspresi mRNA MnSOD tidak berbeda nyata dengan HIF-2 α dan PGC-1 α . Pada hari ke 3, ekspresi mRNA PGC-1 α , Cygb dan MnSOD tidak berbeda secara nyata, serta ekspresi mRNA HIF-2 α tidak

berbeda secara nyata dengan MnSOD. Pada hari ke 5 ekspresi kedua mRNA HIF-1 α dan HIF-2 α tidak ada perbedaan nyata, serta ekspresi Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD tidak ada perbedaan nyata. Pada hari ke 8 sampai hari ke 30, ekspresi mRNA HIF-2 α , PGC-1 α dan MnSOD tidak berbeda secara nyata. Puncak ekspresi HIF-1 α pada hari ke 3 tidak berbeda nyata nilainya dengan ekspresi mRNA HIF-2 α pada saat mencapai puncaknya pada hari ke 8.



Gambar 4.43. Grafik perbandingan ekspresi mRNA HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC -1 α , dan MnSOD,
Eksresi dari hari ke 1 sampai hari ke 30, n = 30

Pada Gambar 4.44, tampak kurva perbandingan rata-rata hasil uji presentase *scanning immunoratio* protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb hasil pewarnaan imunohistokimia. Terdapat perbedaan kenaikan dan penurunan kurva dari ke tiga protein. Protein HIF-1 α mulai menurun nilai rata-rata presentasenya dari hari ke 5, sedangkan keberadaan protein HIF-2 α lebih lama dibandingkan HIF-1 α , dan protein Cygb bertahan paling lama sampai pada hari terakhir pengamatan. Pada hari ke 1 sampai 3, presentase protein HIF-1 α dan Cygb tidak berbeda secara nyata, sedangkan dari hari ke 5 sampai ke 10 presentase HIF-2 α dan Cygb tidak berbeda secara nyata.



Gambar 4.44 Kurva perbandingan rata-rata presentase *Immunoratio* protein HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb, n= 30

4.9.3 Perbandingan rentang waktu ekspresi mRNA dan protein dengan histologi jaringan ekor cecak rumah

Dari hasil perbandingan ekspresi mRNA dan protein pada Tabel 4.1, serta perbandingan keberadaan protein dari hasil uji Western Blot dan imunohistokimia menunjukkan adanya perbedaan rentang waktu ekspresi setiap gen dan protein. Keberadaan protein HIF-1 α dan HIF-2 α lebih lama dibandingkan ekspresi mRNA, sedangkan ekspresi mRNA dan keberadaan protein Cygb terjadi sepanjang pengamatan pertumbuhan jaringan ekor cecak. Demikian pula halnya, ekspresi PGC-1 α , terjadi selama hari pertumbuhan, namun ekspresi mRNA MnSOD hanya mampu bertahan sampai hari ke 8.

Sel leukosit sudah mulai muncul sejak hari pertama pengamatan, demikian pula halnya dengan sel fibroblas dan sel basal lamina. Sel neuron dan ganglion saraf baru muncul pada hari ke 3 pengamatan dan bertahan sampai hari ke 30, walau densitasnya sedikit menurun. Sel endotel baru muncul pada hari ke 5, dan selanjutnya membentuk pembuluh darah baru pada hari ke 13. Jaringan otot baru dan lemak masing-masing baru terbentuk pada hari ke 10 dan hari ke 13.

Tabel 4.1 Perbandingan rentang waktu ekspresi mRNA dan protein dengan histologi jaringan ekor cecak rumah

Hari	HIF 1 α			HIF 2 α			Cyg b			PGC -1 α	MnS OD	1	2	3	4	5	6	7	8	
	a	B	C	A	B	c	A	b	c	a	a									
1	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	√	√	√	-	√	-	-	-	-	-
3	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-	-	-
5	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
8	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-	-
10	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
13	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
17	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
21	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
25	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
30	-	-	-	-	-	-	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

Keterangan :

√ : terdapat ekspresi mRNA / ekspresi protein

- : tidak ada ekspresi

WB : uji Western Blot

IHK : Imunohistokimia

1 : leukosit

2 : fibroblast

3 : neuron dan sel ganglion

4 : sel basal lamina

5 : endotel

6 : otot baru

7 : lemak baru

8 : agregat sel

BAB 5 PEMBAHASAN

5.1. Pertumbuhan Panjang Ekor Cecak Rumah

Penelitian proses regenerasi jaringan pada ekor cecak rumah (*Hemidactylus platyurus*) ini, ditinjau dari aspek hipoksia merupakan penelitian yang pertama kali dilakukan. Penelitian sebelumnya dilakukan pada kadal (*Anolis carollinensis*) yang mengamati aspek histologi dan peran sel saraf pada proses regenerasi jaringan ekor.^{5,36} Penelitian lain mengenai regenerasi jaringan yang menganalisis aspek hipoksia dilakukan pada organ hati tikus,⁵¹ yang struktur organnya berbeda dengan ekor. Peneliti lain meneliti regenerasi jaringan pada hewan vertebrata yang lebih rendah tingkatan taksonominya dibandingkan cecak, serta hewan invertebrata lainnya yang menganalisis proses regenerasi dari aspek berbeda.^{3,46,51}

Cecak rumah dipilih menjadi hewan coba oleh karena mudah diperoleh di lingkungan sekitar dan merupakan hewan vertebrata terdekat klasifikasinya dengan mamalia yang memiliki daya regenerasi tinggi. Menurut Alibardi, cecak adalah kelompok hewan reptil dari Famili *Geckonidae* yang memiliki kemampuan regenerasi tinggi pada ekornya.⁶ Demikian pula menurut Ndukuba, bahwa kelompok genus *Hemidactylus* memiliki kemampuan regenerasi ekor yang sangat tinggi.³⁴ Proses regenerasi jaringan pada cecak berlangsung relatif cepat dan pada hari ke 30 telah terbentuk jaringan lengkap. Organ ekor cecak memiliki mobilitas tinggi dan terletak di luar rongga tubuh, dengan susunan jaringan lengkap meliputi kulit, otot, tulang, saraf, jaringan ikat, darah dan lemak,³⁶ sama halnya seperti jaringan pada organ gerak mamalia. Oleh karena itu ekor cecak rumah sangat tepat dijadikan model sederhana dalam mempelajari proses regenerasi jaringan bahkan organ pada penelitian kami.

Kurva pertumbuhan panjang ekor cecak memperlihatkan tiga periode yang berbeda. Pada 13 hari pertama merupakan tahap penyembuhan luka, pertumbuhannya sangat lambat, dan pada hari ke 13 sampai hari ke 21 pertumbuhan ekor meningkat secara progresif dan merupakan tahap regenerasi jaringan. Pada periode hari ke 21 sampai ke 30 pertumbuhan kembali lambat, merupakan tahap morfogenesis dan pematangan jaringan.

Pada regenerasi organ kulit manusia, terdapat beberapa fase regenerasi yaitu fase penyembuhan luka yang meliputi inflamasi dengan kurva pertumbuhan fase lag,

dilanjutkan dengan fase proliferasi dan regenerasi yang meliputi penutupan luka, angiogenesis dan granulasi atau proliferasi, dan terakhir fase remodeling yang dimulai pada hari ke 21.¹¹

5.1.1 Pertumbuhan jaringan ekor pada hari ke 1 sampai hari ke 13

Pada 13 hari pertama setelah autotomi, kurva pertumbuhan panjang ekor serta analisis histologis jaringan ekor cecak menunjukkan pertumbuhan yang agak lambat. Perbedaan pertumbuhan jaringan ekor pada hari-hari tersebut tidak menunjukkan perbedaan secara nyata, karena pada tahap ini jaringan mengalami proses penyembuhan luka dan kontraksi luka, dan belum mengalami proses regenerasi jaringan. Oleh karena itu pertumbuhan panjang ekor berlangsung relatif lambat. Menurut Mescher, pada awal regenerasi terjadi fase penyembuhan luka, yang ditandai dengan proses proliferasi sel, migrasi dan diferensiasi sel makrofag, sel fibroblas, dan sel progenitor.⁸⁰ Pada regenerasi jaringan ikan zebra, telah diketahui bahwa terjadi migrasi sel pada awal proses regenerasi jaringan dari berbagai organ. Pada regenerasi jaringan jantung ikan zebra terjadi migrasi sel progenitor jantung dan kardiomyosit ke arah tabung jantung.⁸⁴ Pada regenerasi ekor cecak ini, banyak ditemukan sel leukosit, sel mirip fibroblas, sel basal lamina, sel saraf, sel tulang rawan, serta sel otot. Sel leukosit, sel mirip fibroblast, sel saraf menyebar di jaringan dermis dan jaringan ikat, yang aktif berproliferasi dan berdiferensiasi.

Pada sediaan histologi, sel basal lamina pada lapisan epidermis sudah mulai tampak dan mengalami perubahan bentuk yang semakin memipih ke arah tepi lapisan epidermis. Hal tersebut menunjukkan adanya aktivitas sel basal lamina membentuk lapisan epidermis baru. Hal serupa ditemukan pada regenerasi jari tikus, terjadi migrasi dan proliferasi sel epidermis, membentuk lapisan epidermis baru dan berlangsung relatif cepat.⁷⁹

Pada penelitian ini pembentukan epidermis yang baru untuk menutup luka terjadi relatif cepat dalam waktu satu hari setelah luka. Hal ini juga ditemukan pada regenerasi jari salamander, proses pembentukan epitel yang baru juga terjadi relatif cepat untuk menutupi area luka agar proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan dapat berlangsung.⁷⁹

Pada hari ke 5 regenerasi jaringan ekor cecak, lapisan epidermis yang terbentuk relatif lebih tebal. Proses epitelisasi yang berlangsung relatif cepat ini bertujuan untuk melindungi diri dari infeksi dan mempercepat terjadinya regenerasi jaringan. Kejadian ini

berbeda dengan proses penyembuhan luka pada manusia, yang memerlukan waktu berhari-hari untuk proses epitelisasi.¹¹ Terdapat perbedaan yang nyata pertumbuhan ketebalan epidermis dan dermis jaringan ekor cecak, yang menunjukkan adanya aktifitas pada sel epidermis dan dermis pada setiap hari pengamatan.

Sel leukosit muncul mulai dari hari pertama pengamatan dan menyebar ke berbagai ke area luka. Menurut Murdoch, sel makrofag pada dua hari pertama setelah luka akan menyebar pada berbagai jaringan karena perannya memfagositosis bakteri, virus, dan patogen lainnya.⁸² Alibardi juga menemukan adanya peningkatan jumlah leukosit pada area luka pasca autotomi ekor kadal, yang berperan memfagositosis sel yang rusak dan bakteri di area luka.⁶ Tingginya sel leukosit pada jaringan ekor cecak dihubungkan dengan perannya untuk memfagositosis bakteri, sel dan jaringan yang rusak.

Densitas sel mirip fibroblas menunjukkan peningkatan yang berbeda nyata pada 13 hari pertama, hal ini memperlihatkan bahwa terdapat aktivitas sel mirip fibroblas. Pada hari pertama pengamatan sudah banyak ditemukan sel mirip fibroblas pada lapisan dermis serta pada jaringan ikat. Menurut Krafts, sel mirip fibroblas memiliki peran dalam proses pembentukan jaringan darah (angiogenesis).¹ Pada amputasi ekor amfibi, terjadi proliferasi sel yang dimulai dari sel fibroblas pada jaringan ikat yang membentuk jaringan pembuluh darah.⁸¹ Sel mirip fibroblas tampak menyebar pada jaringan dermis serta jaringan ikat ekor cecak, dan tampak adanya kenaikan densitas yang bermakna yang dimulai pada hari ke 3 (Gambar 4.18). Pada saat yang bersamaan terjadi pembentukan sel endotel serta pertambahan ketebalan jaringan dermis. Pada uji korelasi terdapat korelasi kuat antara densitas fibroblas dengan pertambahan panjang ekor, peningkatan ketebalan epidermis dan dermis, serta luas jaringan tulang rawan. Oleh karena itu tampaknya sel mirip fibroblas memiliki peran pada proses regenerasi jaringan ekor cecak pada pembentukan jaringan epidermis dan dermis, serta pada pembentukan jaringan tulang rawan, dan jaringan ikat.

Proliferasi sel juga ditemukan pada ganglion saraf dan sel saraf tepi. Peningkatan densitas sel saraf berbeda secara nyata pada setiap hari pengamatan, dan meningkat secara progresif sampai hari ke 13. Hal tersebut menandakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas proliferasi dan migrasi sel saraf. Pada hari pertama setelah autotomi, ganglion sel saraf tidak tampak dalam jaringan, namun pada hari ke 3 terlihat ganglion saraf sebagai dampak dari aktivitas proliferasi sel saraf yang berlangsung relatif cepat. Hal ini juga ditemukan

oleh Nakatomi, yang meneliti regenerasi sel saraf pada tikus dengan perlakuan iskemia, dalam waktu 2 hari terjadi regenerasi dan diferensiasi sel saraf hipokampus yang berlangsung relatif cepat.⁸ Hasil penelitian Lozito dan Tuan pada regenerasi jaringan ekor kadal, menemukan adanya sel saraf pusat medula spinalis, saraf tepi, dan ganglion. Sel saraf medula spinalis berperan dalam proses pertumbuhan jaringan tulang belakang, sedangkan saraf ganglion merupakan kumpulan sel saraf yang berperan menghantarkan sinyal saraf dari medula spinalis ke sel saraf tepi.²⁸ Hal yang sama juga ditemukan pada penelitian regenerasi ekor cecak ini, adanya sel saraf medula spinalis, sel saraf tepi, dan ganglion saraf. Peningkatan densitas sel saraf sejalan dengan pertumbuhan jaringan tulang rawan pada tulang belakang.

Pada pangkal ekor kadal, yang diteliti Hutchin, terdapat mediator *Neural Growth Factor* (NGF) yang berperan mengatur proses proliferasi dan regenerasi sel saraf. Semakin jauh proses autotomi dari pangkal ekor maka proses regenerasi jaringan ekor akan tumbuh makin tidak normal bahkan bercabang.³ Pada hasil penelitian kami, ditemukan ganglion saraf pada bagian proksimal ekor. Mengacu kepada laporan Hutchin, maka ganglion saraf ini menghasilkan NGF, sehingga pertumbuhan ekor cecak berlangsung normal seperti yang kami temukan. Pada ekor salamander yang diamputasi, hasil penelitian Joven dan Simon banyak ditemukan sel progenitor saraf yang berperan dalam proses regenerasi sel saraf dan bertahan di sepanjang sumbu dorsal-ventral selama regenerasi. Setelah cedera, sel-sel progenitor akan meregulasi pertumbuhan sel endoderm.⁷⁹ Menurut Mescher, NGF memiliki peran menstimulasi proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel saraf.⁸⁰

5.1.2 Pertumbuhan jaringan dari hari ke 13 sampai hari ke 21

Pertambahan panjang jaringan ekor cecak berbeda nyata mulai hari ke 13 sampai hari ke 21. Pada masa ini, jaringan telah tertutup oleh lapisan epidermis yang cukup tebal. Pertambahan ketebalan epidermis dan dermis pada periode ini mengalami kenaikan secara progresif. Dilaporkan juga pada regenerasi kadal hijau, terjadi diferensiasi sel dan jaringan yang berlangsung mulai hari ke 15 setelah autotomi.³⁶ Demikian pula halnya pada jaringan ekor cecak yang mengalami pertumbuhan jaringan yang cukup signifikan pada tahap yang sama.

Jaringan secara aktif melakukan regenerasi membentuk jaringan tulang yang semakin memanjang, pembentukan otot baru yang terjadi mulai pada hari ke 10, timbulnya pembuluh darah baru serta jaringan lemak baru pada hari ke 13. Pertumbuhan jaringan tersebut berasal dari agregat sel tunas pada lapisan dermis yang mulai muncul pada hari ke 10. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Hutchin, yang mengamati regenerasi ekor kadal hijau, pada hari ke 10-15 ditemukan adanya agregat sel yang kaya akan sel embrional.⁵

Jaringan ekor cecak tampak mulai memadat, medula spinalis tumbuh memanjang dari pangkal hingga ujung ekor. Pada jaringan tulang rawan tampak adanya jaringan tulang rawan matang dan tulang rawan belum matang yang banyak mengalami proliferasi sel. Tulang rawan belum matang diapit oleh tulang rawan matang yang kaya akan kalsium. Struktur jaringan tulang rawan seperti ini memungkinkan jaringan ekor cecak untuk tumbuh memanjang dan melebar. Pada tahap ini jaringan tulang rawan memanjang dengan cepat, hasil pertumbuhan tulang rawan pada bagian distal ekor, walaupun pertumbuhan luas tulang rawan pada proksimal secara melintang belum menunjukkan pertumbuhan yang berbeda nyata. Pertumbuhan tulang rawan pada ekor kadal, dikendalikan oleh proliferasi sel mesenkim. Pada awal pertumbuhan tulang rawan, blastema berdiferensiasi dan bermigrasi membentuk jaringan tulang rawan, setelah hari ke 21 tulang rawan pada proksimal tumbuh membesar. Laju pertumbuhan jaringan dikendalikan oleh gen *Indian Hedge hog* (Ihh) yang mengatur laju proses pembelahan sel, serta adanya proses kalsifikasi pada tulang rawan yang menghambat pertumbuhan jaringan.³⁵

5.1.3 Pertumbuhan jaringan pada hari ke 21 hingga hari ke 30

Pada hari ke 21 hingga ke 30, terjadi peningkatan pertumbuhan panjang ekor cecak yang kembali lambat. Pertumbuhan yang lambat ini diduga karena adanya peranan gen Ihh pada proses regenerasi tulang ekor yang berperan mengatur laju proliferasi tulang di daerah distal ekor.³⁵ Namun pertumbuhan luas jaringan tulang rawan proksimal meningkat secara progresif. Temuan yang menarik pada pertumbuhan ekor cecak ini adalah adanya pola pertumbuhan tulang rawan yang berbeda antara tulang rawan distal dan proksimal. Terlihat bahwa faktor pertumbuhan jaringan tulang rawan menstimulasi proses perpanjangan tulang terlebih dahulu, setelah itu diikuti dengan proses perbesaran jaringan tulang rawan di bagian proksimal serta proses kalsifikasi jaringan tulang rawan.

Pertumbuhan jaringan tulang rawan seperti ini, ditemukan oleh Londono, yang menemukan adanya perluasan jaringan tulang rawan proksimal pada kadal hijau dimulai pada hari ke 21. Pertumbuhan tulang rawan distal terjadi lebih dahulu, sehingga ekor kadal memanjang terlebih dahulu.⁸⁵

Proses morfogenesis jaringan ekor terjadi pada hari ke 25, setelah seluruh jaringan terbentuk. Pada masa ini terjadi pematangan jaringan ekor cecak hasil regenerasi, jaringan ekor cecak hasil regenerasi mulai tampak seperti jaringan ekor normal serta mampu melakukan autotomi. Pada grafik tampak kenaikan garis pertumbuhan panjang ekor secara lambat, pada masa ini ekor mulai membentuk sisik serta morfologi lainnya. Hasil penelitian dengan menggunakan Wnt sinyaling pada regenerasi jaringan jari tikus yang diamputasi, menunjukkan peran Wnt sinyaling pada proses keseimbangan morfogenesis dengan pertumbuhan posterior.⁸⁶

5.2 Peranan HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α dan MnSOD pada proses regenerasi jaringan ekor cecak

Pada awal pertumbuhan jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai ke 13, sel-sel pada jaringan ekor cecak aktif melakukan proses migrasi, proliferasi, dan diferensiasi. Pada saat yang bersamaan terjadi peningkatan ekspresi gen HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, MnSOD, dan PGC-1 α , dan menurun setelah hari ke 13, bahkan beberapa gen tidak terekspresikan lagi. Fakta ini menimbulkan dugaan bahwa kelima gen tersebut memiliki peran dalam menstimulasi aktivitas sel embrional untuk melakukan proses migrasi, proliferasi, dan diferensiasi dalam proses regenerasi jaringan selanjutnya.

5.2.1 Peranan HIF-1 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak

Aktivitas yang tinggi dari berbagai sel pada awal pertumbuhan ekor cecak menyebabkan jaringan memerlukan energi dan oksigen yang tinggi untuk mendukung keseluruhan aktivitas tersebut. Pada regenerasi planaria, regenerasi jaringan memerlukan proliferasi dan diferensiasi sel yang berkaitan erat dengan peningkatan kebutuhan akan energi yang tinggi.⁷⁷ Keperluan energi yang tinggi menyebabkan kebutuhan akan oksigen meningkat untuk proses metabolisme pada regenerasi ekor cecak. Tingginya kebutuhan akan oksigen namun oksigen dari lingkungan tidak bertambah menyebabkan jaringan berada dalam keadaan hipoksia relatif. Menurut Gauron, ketidakseimbangan kebutuhan oksigen dengan suplai oksigen menyebabkan jaringan mengalami keadaan hipoksia.⁶²

Keadaan hipoksia dalam jaringan ekor cecak ditandai dengan tingginya HIF-1 α dan HIF-2 α pada tingkat mRNA maupun pada tingkat protein. Stabilitasnya protein HIF-1 α dan HIF-2 α menunjukkan bahwa jaringan berada dalam keadaan hipoksia.

Ekspresi HIF-1 α meningkat secara tajam dan mencapai puncaknya pada hari ke 3, sedangkan ekspresi HIF-2 α baru agak sedikit meningkat. Hal ini diduga karena HIF-1 α bersifat lebih peka terhadap kadar oksigen dalam jaringan, sehingga protein HIF-1 α menjadi lebih cepat mengalami stabilisasi dibandingkan HIF-2 α . Hal ini sesuai dengan penelitian Weidemann yang menyatakan bahwa protein HIF-1 α bersifat sensitif terhadap kadar oksigen dalam jaringan pada keadaan hipoksia, sehingga protein HIF-1 α menjadi stabil.³⁶ Demikian pula halnya pada regenerasi jaringan ekor cecak yang kami amati, terjadi peningkatan HIF-1 α secara dini, yang menunjukkan keadaan hipoksia pada jaringan pada awal regenerasi. Pada regenerasi sirip ikan Zebra, Koblitiz menunjukkan adanya peranan HIF secara dominan dalam keadaan hipoksia.⁷⁵ Dalam penelitian kami ini ditemukan ekspresi HIF-1 α dan HIF 2 α yang cukup bertahan lama sampai hari ke 13. Ekspresi mRNA HIF-1 α dan protein HIF-1 α menunjukkan perbedaan secara nyata pada setiap hari pengamatan. Perbedaan ini menunjukkan bahwa jaringan secara aktif melakukan proses transkripsi menghasilkan mRNA HIF-1 α serta proses translasi menjadi protein HIF-1 α . Hasil uji korelasi antara mRNA HIF-1 α dengan protein HIF-1 α menghasilkan korelasi yang kuat.

Protein HIF-1 α ditemukan pada sel basal lamina, sel leukosit, sel saraf, dan otot lurik. Sel-sel ini berperan aktif dalam proses pertumbuhan jaringan sehingga dapat diperkirakan terjadi peningkatan metabolisme aerob yang menjadikan keadaan hipoksia relatif. Peranan yang sangat penting dari HIF-1 α ditunjukkan oleh Scheerer, peneliti ini mempelajari regenerasi jari distal tikus yang telah diamputasi dengan pembungkaman gen HIF-1 α di sel otot dan mieloid. Pembungkaman pada sel otot tidak berpengaruh terhadap regenerasi, sedangkan pembungkaman pada sel mieloid menghambat regenerasi.²² Selanjutnya Halberg menunjukkan pentingnya HIF-1 α dalam pembentukan serat fibril kolagen pada jaringan lemak mencit.²⁶ Hasil penelitian kami menunjukkan adanya peranan HIF-1 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak, karena ditemukannya protein tersebut pada sel mirip fibroblast dan sel basal lamina yang merupakan sel punca yang aktif berproliferasi membentuk jaringan ekor cecak.

Sesuai dengan kemajuan proses regenerasi dari hari ke 5-13 yang ditandai dengan makin tebalnya jaringan dan makin berdiferensiasinya sel, yang menunjukkan adanya peranan sangat kuat dari HIF-1 α pada pertumbuhan panjang ekor cecak. Kebutuhan mendesak akan oksigen mulai terpenuhi sejalan dengan menurunnya HIF-1 α . Peran HIF-1 α dalam regenerasi jaringan menurut Semenza dan Wang, merupakan protein yang mampu mengendalikan sintesis eritropoetin.¹³ Hu, membuktikan sejumlah protein lain yang regulasinya dikendalikan oleh HIF-1 α .³⁹ Berdasarkan kedua informasi ini, maka pada regenerasi jaringan ekor cecak terbukti bahwa HIF-1 α memiliki peran penting dalam regulasi gen-gen yang diperlukan pada beberapa hari pertama regenerasi. Murdoch menyatakan bahwa pada makrofag terjadi regulasi sejumlah gen dalam keadaan hipoksia yang dikendalikan oleh protein HIF.⁸²

Lebih lanjut menurut Weidemann, HIF-1 α menstimulasi enzim-enzim metabolisme anerob, yaitu enzim transporter glukosa dan enzim glukoneogenesis. Weidemann juga menunjukkan terjadinya peningkatan asam laktat pada metabolisme sel, hal ini berarti HIF-1 α meregulasi sejumlah enzim metabolisme yang responsif terhadap kekurangan oksigen.³⁸ Pengaturan metabolime glineogenesis memerlukan suatu fungsi mitokondria yang utuh yang tidak akan dapat berjalan tanpa adanya oksigen, dengan demikian HIF-1 α juga meregulasi persiapan menghadapi peningkatan metabolisme termasuk penggunaan oksigen. Oleh karena itu mitokondria tidak akan berfungsi tanpa adanya oksigen, maka menurut Schmidt diperlukan keberadaan suatu protein dalam keadaan hipoksia yang mampu mengikat oksigen dari sel darah merah dan membawanya ke dalam mitokondria, yaitu protein Cygb.⁴⁷ Maka dapat diartikan bahwa Cygb berperan mengikat oksigen dan mentransfernya menuju mitokondria untuk digunakan dalam metabolisme glukosa yang diubah menjadi piruvat, dari piruvat menjadi asam laktat. Beberapa enzim berperan dalam perubahan metabolisme aerobmenjadi metabolisme anaerob yang dikendalikan oleh HIF-1 α . Sehingga pada regenerasi jaringan ekor cecak ini, dalam kondisi hipoksia proses metabolisme dan keberlangsungan aktivitas sel dapat tetap terjadi.

Selain meregulasi gen yang berperan dalam metabolisme dan proliferasi, HIF-1 α juga berperan meregulasi gen yang terlibat dalam proses angiogenesis.³⁸ Hal tersebut terbukti dengan munculnya sel endotel pada jaringan ekor cecak setelah ekspresi HIF-1 α turun dan HIF-2 α belum meningkat secara signifikan pada hari ke 3. Akibat terbentuknya

sel endotel pada hari ke 5 yang telah diregulasi gennya oleh HIF-1 α , menyebabkan oksigen mulai ada dalam jaringan, sehingga ekspresi HIF-1 α menurun secara progresif. Penurunan ekspresi HIF-1 α menunjukkan bahwa HIF-1 α sangat sensitif dengan keberadaan oksigen dalam jaringan, serta diduga bahwa HIF-1 α telah selesai melakukan fungsinya dalam regulasi beberapa gen yang berperan dalam proses regenerasi jaringan.

5.2.2 Peranan HIF-2 α pada proses regenerasi jaringan ekor cecak

Kemunculan HIF-2 α baik pada tingkat ekspresi maupun sintesis protein lebih lambat dibandingkan HIF-1 α namun bertahan lebih lama dalam sel. Pada hari ke 5, saat ekspresi HIF-1 α menurun, ekspresi HIF-2 α mulai meningkat secara signifikan. Dari pola kinetik HIF-2 α menunjukkan bahwa protein ini berperan menggantikan HIF-1 α yang muncul lebih cepat dan hilang lebih cepat. Ekspresinya yang lebih lama dalam jaringan adalah upaya jaringan dalam mempertahankan peranannya pada proses regulasi ekspresi gen yang berperan memenuhi kebutuhan akan oksigen yang tinggi.

Ekspresi gen dan protein HIF-2 α berbeda secara bermakna pada setiap hari pengamatan. Hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan aktivitas inti sel dalam proses transkripsi dan translasi HIF-2 α pada regulasi mRNA dan protein tersebut, yang didukung dengan hasil uji korelasi antara mRNA dan protein HIF-2 α bersifat sangat kuat

Ekspresi HIF-2 α mencapai puncaknya pada hari ke 8, pada hari yang sama sel endotel dan pembuluh darah baru semakin banyak dalam jaringan. Menurut Patel dan Simon, HIF-2 α diduga meregulasi gen yang berperan memvaskularisasi sel dan jaringan. HIF-2 α merupakan faktor transkripsi gen VEGF sehingga memiliki peran dalam proses angiogenesis dalam jaringan serta berperan meregulasi gen lainnya selain VEGF.⁴³ Hal tersebut terbukti pada sediaan imunohistokimia jaringan ekor cecak, ditemukan protein HIF-2 α pada sel endotel, sel basal lamina, sel otot lurik, dan sel saraf.

Hasil uji korelasi negatif yang sangat kuat terjadi antara ekspresi HIF-2 α dengan pertumbuhan ketebalan epidermis, serta pertumbuhan luas tulang rawan, dan pertumbuhan ketebalan dermis dan densitas sel saraf. Hal tersebut menunjukkan bahwa HIF-2 α memiliki peranan menstimulasi pertumbuhan jaringan. Pada kondisi jaringan telah terpenuhi oksigen maka peranan HIF-2 α tidak lagi diperlukan pada saat itu, dan jaringan tumbuh secara signifikan. Hal yang sama telah terjadi pada sirip ikan zebra, hasil penelitian Lin, menunjukkan bahwa HIF-2 α memiliki peran dalam proliferasi sel hati ikan

zebra.⁴⁶ Hal ini terbukti pada penelitian kami, yang menemukan adanya peningkatan proliferasi sel setelah ekspresi HIF-2 α .

Pada hari ke 10, ekspresi HIF-2 α menurun, namun keberadaannya dalam jaringan masih dipertahankan sampai hari ke 17, karena diduga berkaitan dengan fungsinya dalam meregulasi gen VEGF yang berperan dalam proses angiogenesis. Keberadaannya sampai hari ke 17, menunjukkan jaringan dalam keadaan hipoksia kronis. Hu meneliti perbedaan ekspresi HIF-1 α dan HIF-2 α pada beberapa sel punca, ternyata HIF-2 α mampu bertahan lebih lama dalam sel dengan kondisi hipoksia kronis dibandingkan HIF-1 α , karena memiliki peran dalam regulasi gen VEGF.⁴³

5.2.3 Peranan Cygb pada proses regenerasi jaringan

Pada hari pertama pengamatan terjadi sintesis Cygb yang relatif lebih tinggi dibandingkan gen lainnya. Pada penelitian yang dilakukan Avivi dengan menggunakan tikus Sparlax pada organ otak, menunjukkan adanya keberadaan mRNA dan protein Cygb dalam keadaan normoksia dan meningkat saat kondisi hipoksia.⁸⁷ Tingginya sintesis Cygb pada hari pengamatan jaringan ekor tikus menandakan adanya keberadaan Cygb pada kondisi sebelum hipoksia.

Meskipun ekspresi kenaikannya lambat untuk mencapai puncaknya pada hari ke 8, sama halnya dengan kenaikan HIF-2 α , namun pada hari yang sama terjadi diferensiasi berbagai sel dan sintesis berbagai senyawa yang diperlukan untuk proses regenerasi organ. Kami menduga, peningkatan ekspresi Cygb dalam jaringan mulai hari ke 5 dalam keadaan hipoksia kronis, menunjukkan peranannya dalam menyuplai oksigen ke dalam rantai respirasi di dalam mitokondria. Menurut Schmidt, dalam keadaan hipoksia, Cygb yang merupakan kelompok globin yang memiliki peran mendifusikan oksigen ke dalam rantai respirasi.⁴⁷ Tingginya daya afinitas Cygb terhadap oksigen membuktikan bahwa Cygb berperan sebagai pembawa oksigen intraseluler. Cygb akan membawa oksigen ke dalam mitokondria untuk reaksi fosforilasi oksidasi, seperti halnya fungsi Mb dalam sel otot.⁸⁷ Hasil penelitian kami membuktikan peranan Cygb yang sangat besar dalam proses regenerasi, yang terus dipertahankan ekspresinya tetap tinggi dibandingkan ke 4 gen lainnya. Keberadaan Cygb berhubungan dengan keberadaan HIF-2 α dan PGC-1 α , sehingga dapat diperkirakan bahwa selama proses regenerasi sejak hari pertama sampai akhir pengamatan, terjadi proses metabolisme sel yang memerlukan oksigen yang sangat

tinggi, hal ini didukung dengan tingginya HIF-2 α sampai hari ke 17, dan bertahannya PGC-1 α di dalam sel.

Gambaran ini juga didukung dari hasil pemeriksaan imunohistokimia tentang keberadaan protein Cygb pada berbagai sel. Pada sediaan dengan pewarnaan imunohistokimia ditemukan protein Cygb pada sel basal lamina, sel mirip fibroblas, mesenkim, sel lemak, dan sel saraf. Pada penelitian dengan menggunakan tikus Spalax ditemukan adanya penyebaran Cygb di sel saraf dan sel fibroblas.⁸⁷ Singh dan Mamen juga menemukan adanya Cygb pada fibroblas yang akan membentuk jaringan ikat.⁸⁸ Singh juga membuktikan adanya peran Cygb pada regenerasi otot skeletal, dengan ditemukannya Cygb pada inti sel basal lamina selama proses regenerasi otot skeletal dan sel basal lamina yang kekurangan Cygb mengalami gangguan pada proses proliferasi dan diferensiasi sel.³⁰

Hasil uji korelasi menghasilkan nilai korelasi negatif sedang antara Cygb dengan variabel pertumbuhan ketebalan dermis, epidermis, dan luas jaringan tulang rawan. Hal ini menunjukkan bahwa pada saat suplai oksigen atau fluks oksigen telah mencukupi, maka ekspresi Cygb dibatasi sampai batas minimum, sedangkan sel dan jaringan terus melakukan pertumbuhan sampai batas tertentu. Keberadaan Cygb dipertahankan di dalam sel untuk menjamin aliran oksigen ke dalam mitokondria.

Ekspresi mRNA dan protein Cygb yang berbeda secara bermakna, pada setiap hari pengamatan, serta adanya korelasi yang sangat kuat antara kedua variabel tersebut menunjukkan adanya aktivitas ekspresi gen dan sintesis protein Cygb.

5.2.4 Peranan PGC-1 α pada proses regenerasi jaringan

Ekspresi PGC-1 α pada hari pertama pengamatan, relatif masih di bawah kontrol. Tingginya aktivitas sel dalam jaringan, menunjukkan tingginya kebutuhan akan energi. Ekspresi PGC-1 α mengalami peningkatan secara progresif dan mencapai puncaknya pada hari ke 3 dan ke 5, hal ini menunjukkan terjadinya peningkatan biogenesis mitokondria yang menunjukkan kebutuhan akan energi yang tinggi. Jornayvaz, membuktikan pertama kali bahwa protein PGC-1 α berperan menstimulasi proses biogenesis mitokondria, sehingga dapat meningkatkan energi dalam jaringan.¹⁹ Hasil penelitian Osuma menunjukkan adanya peningkatan reaksi glikolisis untuk regenerasi jaringan pada planaria.⁷⁷ Menurut pendapat kami, jumlah energi yang dibutuhkan pada proses regenerasi tidak cukup hanya dari proses glikolisis tapi dari proses metabolisme aerob yang

menghasilkan 36 ATP. Oleh karena itu pada proses regenerasi ini dibutuhkan banyak organel seluler berupa mitokondria, hal ini ditunjukkan dengan meningkatnya ekspresi PGC-1 α . Peningkatan ekspresi PGC-1 α pada ekor cecak ini untuk mempertahankan dan mengatur diferensiasi berbagai sel yang bersifat embrional. Perubahan metabolisme pada pertumbuhan planaria memainkan peran penting dalam mengatur regenerasi. Proses glikolisis yang lebih tinggimungkin diperlukan tidak hanya untuk produksi ATP selama regenerasi, tetapi juga untuk mengatur alokasi karbon untuk biosintesis nukleotida, fosfolipid, dan asam amino yang dibutuhkan untuk pertumbuhan jaringan baru.

Pada hari ke 8 ekspresi gen PGC-1 α pada jaringan menurun, namun ekspresinya tetap dipertahankan di atas kontrol sampai hari terakhir pengamatan. Diduga bahwa, saat ekspresi gen PGC-1 α mencapai puncaknya terjadi peningkatan biogenesis mitokondria sehingga sel telah memiliki kecukupan energi. Ekspresi gen PGC-1 α tetap dipertahankan untuk menjaga agar persediaan energi tetap tinggi dalam jaringan sampai proses regenerasi jaringan berakhir. Ekspresi gen pada setiap hari pengamatan memiliki perbedaan yang bermakna, membuktikan bahwa terjadi aktivitas gen PGC-1 α .

Korelasi negatif sedang terjadi antara ekspresi PGC-1 α dengan pertumbuhan panjang ekor, serta dengan pertumbuhan ketebalan epidermis, pertumbuhan tulang rawan, serta dengan densitas sel mirip fibroblast. Hal ini membuktikan bahwa PGC-1 α berperan menstimulasi pertumbuhan jaringan secara tidak langsung dengan penyediaan mitokondria, pada saat kesediaan mitokondria dalam sel mencukupi, maka jaringan melakukan regenerasi dan ekspresi PGC-1 α menurun.

5.2.5 Peranan MnSOD pada proses regenerasi jaringan ekor cecak

Ekspresi mRNA MnSOD mulai meningkat pada hari ke 8, hal tersebut diduga berkaitan dengan peranannya dalam menetralkan senyawa radikal berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari rantai respirasi karena kondisi hipoksia. Meskipun pada penelitian kali ini pengamatan dilakukan hanya pada batas hasil transkripsi mRNA, namun besar kemungkinan akan disintesis menjadi protein MnSOD yang berperan menetralkan ROS yang dapat menyebabkan kerusakan pada sel dan jaringan. Hasil penelitian dengan menggunakan jaringan organ tikus, memperlihatkan bahwa pembungkaman gen MnSOD dapat menyebabkan tingginya ROS yang berlebihan sehingga menghambat pertumbuhan jaringan, walaupun pada awal ekspresi, ROS

menstimulasi pertumbuhan jaringan, namun ROS berlebih dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan jaringan.⁸⁹

Stimulasi transkripsi gen SOD terjadi karena adanya senyawa ROS dalam sel. Adanya senyawa ROS pada proses regenerasi cecak berkaitan erat dengan peranannya dalam stimulasi proliferasi sel. Hasil penelitian Love dengan mengamputasi ekor kecebong menunjukkan adanya ROS pada beberapa hari setelah amputasi, yang memiliki peran pada proses proliferasi sel dan jaringan kecebong.⁷⁸ Namun produksi ROS yang berlebih dapat menyebabkan gangguan fungsi sel, akibat tingginya proses respirasi sel yang menghasilkan ion superoksida. Oleh karena itu diperlukan enzim yang mampu menetralkan senyawa ROS yaitu MnSOD. Demikian pula halnya pada amputasi ekor *Xenopus*, timbul ROS beberapa jam setelah amputasi dan menstimulasi proliferasi sel dan pembentukan blastemal (sel tunas).⁶² Pada jaringan ekor cecak tampak ekspresi MnSOD yang berbeda secara nyata pada setiap hari pengamatan menunjukkan adanya aktivitas gen tersebut.

5.3 Rangkuman proses regenerasi jaringan ekor cecak

Pada awal pertumbuhan regenerasi jaringan ekor cecak terjadi pertumbuhan yang sangat lambat, karena periode ini merupakan periode penyembuhan luka. Sel secara aktif berdiferensiasi, bermigrasi, dan berproliferasi. Tingginya ekspresi HIF-1 α pada awal pertumbuhan, menandakan jaringan dalam keadaan hipoksia. Hal tersebut menjawab hipotesis pertama dari penelitian ini. Pada saat yang bersamaan ekspresi *Cygb* belum meningkat secara bermakna. Kurangnya oksigen dalam sel dan jaringan menyebabkan kurangnya energi dalam jaringan, sehingga HIF-1 α meregulasi gen yang berperan dalam proses metabolisme anaerob, sehingga kebutuhan akan energi untuk aktivitas sel terpenuhi. Pada saat yang sama ekspresi PGC-1 α juga meningkat, diduga PGC-1 α juga berupaya memenuhi kebutuhan akan energi dengan melakukan biogenesis mitokondria. Meningkatnya PGC-1 α telah menjawab hipotesis ke tiga dari penelitian ini, bahwa dalam proses regenerasi jaringan ekor cecak terdapat peningkatan biogenesis mitokondria karena kebutuhan energi yang tinggi. HIF-1 α juga memiliki peran dalam regulasi gen untuk proliferasi sel dan proses angiogenesis. Terbukti saat ekspresi HIF-1 α turun, proliferasi sel meningkat secara bermakna, serta munculnya sel endotel.

Saat ekspresi HIF-1 α menurun, HIF-2 α menggantikan posisi HIF-1 α , meregulasi gen yang berperan pada proses angiogenesis serta proliferasi sel lainnya. Ekspresi HIF-2 α bersamaan dengan ekspresi Cygb yang mencapai puncaknya pada hari ke 8. Pada periode ini jaringan masih mengalami hipoksia, Dalam keadaan hipoksia kronis, kebutuhan akan oksigen dipenuhi oleh Cygb yang memiliki kemampuan mendifusikan oksigen dan kebutuhan akan energi dipenuhi oleh PGC-1 α . Tingginya ekspresi Cygb dalam jaringan ekor cecak sesuai dengan hipotesis penelitian yang kedua bahwa pada proses regenerasi jaringan ekor cecak membutuhkan oksigen yang akan terpenuhi oleh tingginya Cygb. Ekspresi Cygb dan PGC-1 α menurun sampai hari ke 30, walau masih dipertahankan jaringan dengan kuantitas relatif di atas kontrol, untuk memenuhi kebutuhan akan oksigen dan energi selama proses regenerasi jaringan berlangsung. Gen MnSOD meningkat pada hari ke 8 karena adanya senyawa radikal akibat kondisi hipoksia yang akan dinetralkan oleh MnSOD. Terjadinya peningkatan MnSOD dalam jaringan sesuai dengan hipotesis penelitian yang ke empat, yang berkaitan dengan peranannya dalam menetralkan radikal dalam jaringan akibat keadaan hipoksia.

Pada saat ke 5 gen ekspresinya mulai menurun, pada hari ke 13 pertumbuhan jaringan ekor cecak meningkat secara signifikan. Diduga bahwa HIF-1 α dan HIF-2 α telah meregulasi berbagai gen yang diperlukan untuk proses regenerasi jaringan. Pada saat ini jaringan telah siap melakukan proses regenerasi jaringan, dengan membentuk berbagai jaringan yang dibutuhkan ekor cecak antara lain, jaringan epitel, jaringan tulang, jaringan lemak, jaringan otot, jaringan saraf, jaringan epidermis dan jaringan ikat. Pada hari ke 21 sampai hari ke 30 pertumbuhan panjang jaringan ekor cecak kembali lambat. Pada saat ini jaringan ekor cecak mengalami proses morfogenesis, sehingga tidak terjadi pertumbuhan jaringan yang cukup bermakna.

Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak ini terjadi dinamika pengaturan ekspresi gen dan protein yang memiliki peranan penting dalam mengatasi keadaan hipoksia. Sehingga, setelah ekspresi gen dan protein tersebut mampu mengatasi keadaan hipoksia, terjadi regenerasi jaringan dan ekor cecak tumbuh. Maka, aspek hipoksia dalam proses regenerasi jaringan cecak ini memiliki peran penting, sehingga jaringan mampu melakukan regenerasi. Hal tersebut sesuai dengan hipotesis yang ke lima, bahwa perubahan ekspresi gen dan protein dalam upayanya mengatasi hipoksia memiliki peran terhadap proses regenerasi jaringan ekor cecak.⁷⁷

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Proses regenerasi jaringan ekor cecak terjadi dalam keadaan hipoksia, yang ditandai dengan stabilnya protein HIF-1 α dan HIF-2 α yang memiliki peran penting dalam mengatasi keadaan hipoksia dengan regulasi beberapa gen yang berperan pada proses regenerasi jaringan
2. Protein Cygb terekspresikan selama proses regenerasi jaringan, berkaitan dengan perannya dalam suplai oksigen ke dalam jaringan
3. Tingginya ekspresi PGC-1 α , menunjukkan tingginya proses biogenesis mitokondria untuk memenuhi kebutuhan akan energi selama regenerasi jaringan berlangsung
4. Ekspresi MnSOD yang tinggi diduga berkaitan erat dengan perannya dalam menetralkan radikal bebas, sehingga pertumbuhan jaringan dapat tetap berlangsung.
5. Ke lima gen HIF-1 α , HIF-2 α , Cygb, PGC-1 α , dan MnSOD saling bersinergi memainkan perannya dalam proses regenerasi jaringan yang berkaitan erat dengan pertumbuhan berbagai sel dalam jaringan membentuk organ utuh.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisis peranan gen HIF-1 α , HIF-2 α , dan Cygb dalam proses regenerasi jaringan dengan menghambat ekspresinya
2. Perlu dilakukan analisis peranan sel saraf dan jaringan tulang dalam proses regenerasi jaringan dalam keadaan hipoksia
3. Analisis lebih lanjut peranan jaringan lemak yang kaya akan sel embrional dalam proses regenerasi jaringan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Krafts KP. The hidden drama Tissue repair. *Organogenesis*. 2010; 6 (4): 225–33.
2. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006; 43 (2 SUPPL. 1): 45–53.
3. Guedelhofer OC, Alvarado AS. Amputation induces stem cell mobilization to sites of injury during planarian regeneration. *Development*. 2012; 139 (19): 3510–20.
4. Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18 (1): 36–45.
5. Hutchins ED, Markov GJ, Eckalbar WL, George RM, King JM, Tokuyama MA, et al. Transcriptomic analysis of tail regeneration in the lizard *Anolis carolinensis* reveals activation of conserved vertebrate developmental and repair mechanisms. *PLoS One*. 2014; 9 (8).
6. Alibardi L. *Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb regeneration in Lizards*. New York: Springer; 2010.
7. Soesilo N. *Regenerasi ekor kadal (Eutropis multifasciata Kuhl) dan prospek aplikasinya*. Yogyakarta; 2009. Pidato pengukuhan Guru Besar Universitas Gajah Mada.
8. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S ichi, Hatano O, Kawahara N, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 2002; 110 (4): 429–41.
9. Rishikaysh P, Dev K, Diaz D, Shaikh Qureshi WM, Filip S, Mokry J. Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. *Int J Mol Sci*. 2014; 15 (1): 1647–70.
10. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004; 91 (1): 4–15.
11. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49 (1): 35–43.
12. Gilkes DM, Chaturvedi P, Bajpai S, Wong CC, Wei H, Pitcairn S, et al. Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2013;

- 73 (11): 3285–96.
13. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992; 12 (12): 5447–54.
 14. Lee J-W, Bae S-H, Jeong J-W, Kim S-H, Kim K-W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med.* 2004; 36 (1): 1–12.
 15. Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T. Cytoglobin: A novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol.* 2002; 19 (4): 416–21.
 16. Liu Y, Zhou Q, Wang Y, Luo L, Yang J, Yang L, et al. Gekko japonicus genome reveals evolution of adhesive toe pads and tail regeneration. *Nat Commun.* 2015; 6: 1–11.
 17. Duguez S, Féasson L, Denis C, Freyssenet D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 282 (4): E802–9.
 18. Allen JWA. Cytochrome c biogenesis in mitochondria - Systems III and v. *FEBS J.* 2011; 278 (22): 4198–216.
 19. Jornayvaz FR, Shulman GIG. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010; 47: 69–84.
 20. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 2009; 417 (1): 1–13.
 21. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med.* 2008; 3 (1): 1–5.
 22. Scheerer N, Dehne N, Stockmann C, Swoboda S, Baba HA, Neugebauer A, et al. Myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 Is Essential for Skeletal Muscle Regeneration in Mice. *J Immunol.* 2013; 191 (1): 407–14.
 23. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis K, Loridas S. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10 (9): 3886–907.
 24. Winter a D, Page a P. Prolyl 4-hydroxylase is an essential procollagen-modifying enzyme required for exoskeleton formation and the maintenance of body shape in

- the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*. 2000; 20 (11): 4084–93.
25. Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. 2002; 35 (5): 1010–21.
 26. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol Cell Biol*. 2009; 29 (16): 4467–83.
 27. Mallo M, Wellik DM, Deschamps J. Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan. *Dev Biol*. 2010; 344 (1): 7–15.
 28. Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail skeletal regeneration combines aspects of fracture healing and blastema-based regeneration. *Development*. 2016; 143 (16): 2946–57.
 29. Yun MH, Gates PB, Brockes JP. Sustained ERK activation underlies reprogramming in regeneration-competent salamander cells and distinguishes them from their mammalian counterparts. *Stem Cell Reports*. 2014; 3 (1): 15–23.
 30. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006; 20 (13): 1692–708.
 31. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007; 46 (1): 219–28.
 32. Danie Kingsley J, Ranjan S, Dasgupta N, Saha P. Nanotechnology for tissue engineering: Need, techniques and applications. *J Pharm Res*. 2013; 7 (2): 200–4.
 33. Fisher RE, Geiger LA, Stroik LK, Hutchins ED, George RM, Denardo DF, et al. A Histological Comparison of the Original and Regenerated Tail in the Green Anole, *Anolis carolinensis*. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol*. 2012; 295 (10): 1609–19.
 34. Ifeanyichukwu P. Neural Tissue And Complete Regeneration Of The Tail Of The Gekkonid Lizard , *Hemidactylus flaviviridis*. *Anim Res Int*. 2006; 3: 415–8.
 35. Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail regeneration: Regulation of two distinct cartilage regions by Indian hedgehog. *Dev Biol*. 2015; 399 (2): 249–62.
 36. Ritzman TB, Stroik LK, Julik E, Hutchins ED, Lasku E, Denardo DF, et al. The Gross Anatomy of the Original and Regenerated Tail in the Green Anole (*Anolis*

- carolinensis). *Anat Rec.* 2012; 295 (10): 1596–608.
37. Jusman SW, Halim A, Wanandi SI, Sadikin M. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) related to oxidative stress in liver of rat-induced by systemic chronic normobaric hypoxia. *Acta Med Indones.* 2010; 42 (1): 17–23.
 38. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ.* 2008; 15 (4): 621–7.
 39. Hu C, Wang L, Chodosh L a, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (24): 9361–74.
 40. Hendrawan S, Jusman SW a, Ferdinal F, Prijanti AR, Wanandi SI, Sadikin M. Expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) gene and apoptosis in the heart induced by systemic hypoxia. *Med J Indones.* 2009; 18 (2): 97–101.
 41. Pirkmajer, S., D. Filipovic, T.Mars KM& ZG. HIF-1_ response to hypoxia is functionally separated from the glucocorticoid stress response in the in vitro -regenerating human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 299: R1693–R1700.
 42. Darwin M, Kalim H, S DW, Sudoyo AW, Fatchiyah. Vascular Endothelial Growth Factor pada Penderita Kanker Payudara dengan Anemia Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression Induce Erythropoietin and Vascular Endothelial Growth Factor Expression on Breast Cancer with Anemia. *J Kedokt Brawijaya.* 2012; 27 (2): 77–82.
 43. Hu C, Iyer S, Sataur A, Covelto KL, Chodosh LA, Simon MC. Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in stem cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26 (9): 3514–26.
 44. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 2002; 295 (5556): 858–61.
 45. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008; 15 (4): 628–34.
 46. Lin TY, Chou CF, Chung HY, Chiang CY, Li CH, Wu JL, et al. Hypoxia-inducible factor 2 α is essential for hepatic outgrowth and functions via the regulation of leg1 transcription in the zebrafish embryo. *PLoS One.* 2014; 9 (7).

47. Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, et al. Cytooglobin Is a Respiratory Protein in Connective Tissue and Neurons, Which Is Up-regulated by Hypoxia. *J Biol Chem*. 2004; 279 (9): 8063–9.
48. Kawada N. Molecular mechanism of stellate cell activation and therapeutic strategy for liver fibrosis. *Comp Hepatol*. 2004; 3 Suppl 1: S3.
49. Sha S. Functional Characterization of cytooglobin. University of Hong Kong; 2011.
50. Lechavue C, Chauvierre C, Dewilde S, Moens L, Green BN, Marden MC, et al. Cytooglobin conformations and disulfide bond formation. *FEBS J*. 2010; 277 (12): 2696–704.
51. Jusman SWA, Iswanti FC, Suyatna FD, Ferdinal F, Wanandi SI, Sadikin M. Cytooglobin expression in oxidative stressed liver during systemic chronic normobaric hypoxia and relation with HIF-1 α . *Med J Indones*. 2014; 23 (3): 133–8.
52. Nakatani Y, Kawakami A, Kudo A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev Growth Differ*. 2007; 49: 145–54.
53. Liu X, Tong J, Zweier JR, Follmer D, Hemann C, Ismail RS, et al. Differences in oxygen-dependent nitric oxide metabolism by cytooglobin and myoglobin account for their differing functional roles. *FEBS J*. 2013; 280 (15): 3621–31.
54. Artika I. Struktur, fungsi dan biogenesis mitokondria. *Eijkman Lect Ser I Mitochondrial Med*. 2003; 17–42.
55. Prigione A & JA. A mitochondrial strategy for safeguarding the reprogrammed genome. *Cell*. 2014; 24–34.
56. Laura A Sena, Navdeep S Chandel. Physiological roles of mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol Cell*. 2012; 32 (9): 54–62.
57. Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*. 2005; 1 (6): 409–14.
58. Li L, Pan R, Li R, Niemann B, Aurich A, Chen Y, et al. Mitochondrial Biogenesis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1 alpha) Deacetylation by Physical Activity. *Diabetes*. 2011; 60 (January): 157–67.

59. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biohys Acta*. 2011; 1813 (7): 1269–78.
60. Wright DC, Han DH, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1?? expression. *J Biol Chem*. 2007; 282(1): 194–9.
61. Zainuri M, Rif'ati L, Expression OF, Inducible H, Hypoxia F-H-ON. Kajian Peran Manganese-Containing Super Oxide Dismutase (Mnsod) Dalam Regulasi Ekspresi Hypoxia Inducible Factor- 1A (Hif- 1A) Pada Keadaan Hipoksia. *Media Litbangkes*. 2013; 23 (4): 143–8.
62. Gauron C, Rampon C, Bouzaffour M, Ipendey E, Teillon J, Volovitch M, et al. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep*. 2013; 3: 1–9.
63. Bansal R, Karanth KP. Phylogenetic Analysis and Molecular Dating Suggest That *Hemidactylus anamallensis* Is Not a Member of the *Hemidactylus* Radiation and Has an Ancient Late Cretaceous Origin. *PLoS One*. 2013; 8 (5): 72-9.
64. Tkaczenko GK, Weterings R, Weterings R. Prey preference of the common house geckos *Hemidactylus frenatus* and *Hemidactylus Platyrurus*. *Herpetol Notes*. 2014; 7 (August): 483–8.
65. Zug GR, Vindum J V, Koo MS. Burmese *Hemidactylus* (Reptilia , Squamata , Gekkonidae): Taxonomic Notes on Tropical Asian *Hemidactylus*. *Sci York*. 2007; 58 (19): 387–405.
66. Kongbuntad W, Tantrawatpan C, Pilap W, Jongsomchai K, Chanaboon T, Laotongsan P, et al. Genetic diversity of the red-spotted tokay gecko (*Gekko gecko* Linnaeus, 1758) (Squamata: Gekkonidae) in Southeast Asia determined with multilocus enzyme electrophoresis. *J Asia-Pacific Biodivers*. 2016; 9 (1): 63–8.
67. Hawkeswood TJ. Observations on the reptile fauna of Queen.Sirikit, Bangkok. *Calodema*. 2017; 441: 1-7.
68. Prabhakar, N.R. & Semenza GL. Description and Physical Characteristics of Reptiles: Adaptives and Maladaptive Cardiorespiratory Respons to Continous and Intemittent Hypoxia Mediated Hipoxia-Inducible Factor 1 and 2. *Physiol Rev Publ*. 2012; 92: 967–1003.
69. L.P.Jayatissa. Present Status of Mangroves in Sri Lanka. *The National Red List*

- 2012 of Sri Lanka; Conservation Status of the Fauna and Flora. 2012. 77-87 p.
70. Tahrin Mahmood P-CY. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *NAm J Med Sci*. 2012; 4 (9): 429–34.
71. Ramadhani D, Kurnia I, Soetopo S, Tetriana D, Ramli I, Budiningsih, Andrijono, Kurjana T, Tobing MDL. Analisis Serta Stitching Citra Imunohistokimia Mib-1 Dengan Immunoratio dan perangkat lunak Nish Element. *Lokakarya Komputasi dalam Sains dan Teknologi Nuklir*. 2012; (October): 187-96.
72. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*. 2006; 3 (3): 187–97.
73. Dian D, Sumantri S, Firman RN, Azhari A, Radiologi D, Gigi K, et al. Analisis radiograf periapikal menggunakan software imageJ pada abses periapikal setelah perawatan endodontik terlihat dengan melakukan image processing pada metode analisis observasional menggunakan 31 pada suspek abses periapikal periode Januari- Agustus di RSGM Unpad Bandung . *Penelitian Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung*. 2017; 3 (1): 29–34.
74. Sopiudin Dahlan. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. 6 th ed. Jakarta: Epidemiologi Indonesia; 2013. xxiv+312.
75. Köblitz L, Fiechtner B, Baus K, Lussnig R, Pelster B. Developmental expression and hypoxic induction of hypoxia inducible transcription factors in the zebrafish. *PLoS One*. 2015; 10 (6): 1–15.
76. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993; 268 (29): 21513–8.
77. Osuma EA, Riggs DW, Gibb AA, Hill BG. High throughput measurement of metabolism in planarians reveals activation of glycolysis during regeneration. *Regeneration*. Wiley Regeneration. 2017; (August): 1–9.
78. Love NR, Chen Y, Ishibashi S, Kritsiligkou P, Lea R, Koh Y, et al. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol*. 2013; 15 (2): 222–8.
79. Payzin-dogru D, Whited JL. An integrative framework for salamander and mouse limb regeneration. *Intl J Dev Bio*. 2018; 402 (62): 393–402.

80. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Wiley Regeneration*. 2017; 4: 39–53.
81. Joven A, Simon A. Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Prog Neurobiol*. 2018; (March): 0–1.
82. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation. *J Immunol*. 2005; 175 (10): 6257–63.
83. Marcela C, Gómez A, Delgado JP, Molina AG, Zapata JD. Limb regeneration in a direct-developing terrestrial salamander, *Bolitoglossa ramosi* (Caudata: Plethodontidae) Limb regeneration in plethodontid salamanders. *Wiley Regeneration*. 2017; 4: 227–35.
84. Tahara N, Brush M, Kawakami Y, Cell Migration During Heart Regeneration in Zebrafish. *Dev Dyn*. 2016; 245 (7): 774–87.
85. Londono R, Wenzhong W, Wang B, Tuan RS. Cartilage and Muscle Cell Fate and Origins during Lizard Tail Regeneration. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*. 2017; 5 (70): 1–9.
86. Greijer AE, Van Der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004; 57 (10): 1009–14.
87. Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E. Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. *PNAS*. 2010; 107 (50): 21570-5.
88. Singh S, Canseco DC, Manda SM, Shelton JM, Chirumamilla RR, Goetsch SC, et al. Cytoglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci*. 2014; 111 (1): E129–38.
89. Marecki JC, Parajuli N, Crow JP, MacMillan-Crow LA. The Use of the Cre/ *loxP* System to Study Oxidative Stress in Tissue-Specific Manganese Superoxide Dismutase Knockout Models. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20 (10): 1655–70.

DAFTAR RIWAYAT HIDUP**DATA PRIBADI**

Nama : Titta Novianti
Tempat, Tanggal Lahir : Bandung, 18 November 1968
Agama : Islam
Pekerjaan : Dosen Program Studi Bioteknologi
Universitas Esa Unggul
E mail : titta@esaunggul.ac.id

PENDIDIKAN FORMAL

1981 : SD BPI Bandung
1984 : SMP BPI I Bandung
1987 : SMA Negeri 3 Bandung
1992 : Sarjana S1 Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Indonesia
2006 : Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

PENDIDIKAN/PELATIHAN/KURSUS**2017:**

1. Penulisan Borang Akreditasi, Agustus 2018, Universitas Ubaya, Surabaya, Penyelenggara KOBIL.
2. EAP/ESP Workshop For 60 Hours In Asia University Taiwan, 16-22 Agustus 2017.
3. Pelatihan Alat Laboratorium Infinite M 200 Pro Nanoquant, Universitas Esa Unggul, Mei 2017.
4. Training CFX Connect Real Time PCR, Universitas Esa Unggul, Februari 2017
5. Workshop Teknik Dasar Dan Pengelolaan Laboratorium Biomedik, PRVKP FKUI, Januari 2017
6. Peserta Dalam Kegiatan Capaian Pembelajaran Program Studi Biologi Dan Pendidikan Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Maret 2017.

2016 :

7. Workshop Teknik Konversi Modul Perkuliahan Menjadi Buku Ajar 2016, Agustus 2016.
8. Workshop Pelatihan Penulisan Artikel Ilmiah, DIKTI, Agustus 2016
9. Pelatihan Metode Penelitian Dan Pengolahan Data Dengan Struktural Equation Modeling (SEM), Universitas Esa Unggul, Februari 2016
10. Workshop Kurikulum Dan Seminar Bioteknologi, Universitas Esa Unggul dengan KBI, Januari 2016
11. Two Day Workshop Student Centered Learning Di Perguruan Tinggi Dengan Menerapkan Problem Based Learning, UI, Januari 2016
12. Workshop Genome Editing Dan Bioinformatika, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri, Bogor, Oktober 2016

2015 :

13. Pelatihan Penulisan Artikel Berbahasa Inggris Untuk Jurnal Internasional Dan Kiat Dalam Menembus Indeksasi Scopus, Mei 2015
14. Rapid and Realible Porcine DNA Detection Using LAMP ASSAY, Januari 2015. BPOM-MUI, Bogor, Januari 2015.

2013 :

15. Peserta Workshop Penyusunan Proposal Program Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, PTS Wilayah III DKI Jakarta, April 2013.
16. Peserta lokakarya Konversi dan Supervisi Pengembangan Buku Digital, Maret 2013

RIWAYAT PEKERJAAN

- 1994-1999 : Asisten Peneliti di Laboratorium Ekologi Sekolah Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung
- 2005-2009 : Dosen Tidak Tetap Universitas Borobudur
- 2006-2010 : Dosen Tidak Tetap STIKES Binawan
- 2006-2012 : Dosen Tidak Tetap STIKES IMC
- 2007-sekarang : Dosen Tetap Universitas Esa Unggul Jakarta

KARYA ILMIAH

1. Novianti T, Juniantito V, Arida EA, Jusuf AA, Jusman SA, Sadikin M. 2018. Relative Hypoxia in Tissue Regeneration of House Gecko (*Hemidactylus platyurus*) Tail as Indicated By HIF-1 α and HIF-2 α Expression. Submitted. Organogenesis Journal.
2. Novianti T, Juniantito V, Arida EA, Jusuf AA, Jusman SA, Sadikin M. 2018. HIF-1 α expression during tissue regeneration of house-gecko tail (*Hemidactylus platyurus*). Prosiding Abstrak dalam Seminar CHOSS. Departemen Biokimia FKUI.
3. Novianti T, Sadikin, Widia S, Juniantito V, Arida EA. 2018. Development of unidentified DNA-specific HIF- 1 α gene of lizard (*Hemidactylus platyurus*) which plays a role in tissue regeneration process. Published under licence by IOP Publishing Ltd. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Volume 130, conference 1.
4. Novianti T, Sadikin M, Jusman SA, Juniantito V, Arida EA. 2017. Descriptive of histology cells In every phase tissue regeneration of tailed gecko (*Hemidactylus Platyurus*), Poster in International Seminar of Understanding of Hypoxia and understanding of stress Studies. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine University of Indonesia.
5. Novianti T, Sadikin M, Jusman SA, Juniantito V, Arida EA. 2016. Deskripsi Histologi Fase Wound healing (penyembuhan luka) pada regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*). Prosiding Seminar From Basic Science to comprehensive Education. UIN Alaudin Makasar
6. Novianti T, Sadikin M, Jusman SA, Juniantito V, Arida EA. 2016. Ekspresi sel pada Histologi regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*), Prosiding Seminar Lahan Basah Universitas Lambung Mangkurat.
7. Novianti, T. Analisis komparasi kandungan timbal pada urine pasien kanker payudara dan wanita normal. 2016. Jurnal Keperawatan Universitas Esa Unggul; Vol I: 1.
8. Novianti, T. Analisis Korelasi Aktivitas Masyarakat Perkotaan Pengguna Kendaraan Bermotor dengan Jumlah Sel Darah Merah yang mengalami Hemolisis. 2017. Jurnal Keperawatan Universitas Esa Unggul. Vol 1: 2.

9. Novianti, T. Analisis Kerusakan Rambut pada wanita pengguna kendaraan motor di daerah kota Tangerang Selatan. 2017. Indonesian Journal of Biotechnology and Biodiversity Indonesia, Universitas Esa Unggul. Vol 1: 1.

PERAN SERTA DALAM KEGIATAN ILMIAH

2018 :

1. Oral presenter dalam seminar nasional “Undertanding Hypoxia and oxidative stress in imunity” yang diselenggarakan Center of Hypoxia and Oxidative Stress Studies departemen Biokimia Fakultas Kedokteran UI, Juli 2018.

2017 :

1. Oral Presenter In International Conference On Biological Sciences And Biotechnology. Di Universitas Sumatera Utara, Agustus 2017.
2. Oral presenter dalam Seminar Bioteknologi, Universitas Esa Unggul, November 2017.
3. Penyusun Naskah Kurikulum Program Studi Bioteknologi se Indonesia. Universitas Pelita Harapan, Februari 2017.
4. Observer Konferensi KOBİ. USU, Medan 22 Agustus 2017
5. Observer Dalam Kegiatan Rapat Koordinasi Nasional KOBİ, 4 Mei 2017
6. Peserta Kuliah Tamu Pentingnya Kaji Etik Dalam Penelitian, April 2017
7. Peserta Sosialisasi Panduan Penelitian Dan Pengabdian Pada Masyarakat Edisi Xi, April 2017
8. Peserta Rapat Koordinasi Nasional Konsorsium Biologi Indonesia, Maret 2017

2016 :

9. Pemakalah Seminar Nasional Lahan Basah, Universiats Lambung Mangkurat, November 2016.
10. Pemakalah poster dalam International Meeting of Hypoxia and Oxidative Stres Studies. Understanding of Hypoxia and Oxidative Stress in cancer, Oktober 2016.
11. Pemakalah Dalam Seminar Nasional Biologi To Basic Science To Comperhensive Education, Agustus 2016

ORGANISASI ILMIAH

1. Anggota Konsorsium Bioteknologi Indonesia (KBI) (2016-..)

2. Anggota Konsorsium Biologi Indonesia (KOBBI) (2016 -....)
3. Pengurus Ikatan Program Studi Bioteknologi Indonesia (IPSBI) (2017-...)
4. Pengurus Masyarakat Bioinformatika dan Biodiversity Indonesia (MABBI) (2018-....)

1. Data rata-rata pertambahan panjang ekor Cecak (*Hemidactylus platyurus*) dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi tidak normal ($p < 0,05$)

Pengulangan	panjang ekor (cm)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	0,04	0,18	0,22	0,3	0,5	0,8	1,2	1,4	1,6	1,7
2	0,05	0,14	0,28	0,5	0,5	0,7	1,2	1,6	1,8	2
3	0,06	0,13	0,25	0,4	0,5	0,9	1,2	1,5	1,7	1,7
\bar{x}	0,05	0,15	0,25	0,4	0,5	0,8	1,2	1,5	1,7	1,8
SD	0,01	0,03	0,03	0,10	0,00	0,10	0,00	0,10	0,10	0,17
SEM	0,01	0,01	0,02	0,05	0,00	0,05	0,00	0,05	0,05	0,09

2. Ekspresi mRNA HIF-1 α relatif terhadap kontrol (rumus livak) dari hari ke 1-30 data berdistribusi tidak normal $p < 0,05$

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA HIF-1a relatif terhadap kontrol (rumus livak)									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	2,12	5,27	0,18	0,23	0,18	0,16	0,03	0	0,03	0,01
2	2,87	7,81	1,74	0,07	0,02	0	0,02	0,01	0	0
3	3,28	8,15	2,16	0	0	0	0	0,02	0	0
\bar{x}	2,75	7,077	1,36	0,1	0,067	0,053	0,0167	0,01	0,01	0,003
SD	0,59	1,57	1,04	0,12	0,10	0,09	0,02	0,01	0,02	0,01
SEM	0,26	0,70	0,47	0,05	0,04	0,04	0,01	0,00	0,01	0,00

3. Ekspresi mRNA HIF-2 α relatif terhadap kontrol (rumus livak) dari hari ke 1-30 data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA HIF-2a relatif terhadap kontrol (rumus livak)									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	2,45	3,45	6,06	8,98	6,08	1,94	3,24	0,68	0,17	1,09
2	1,57	2,83	5,92	5,83	5,12	2,04	1,68	0,45	0,15	0
3	2,38	4,86	2,87	6,28	2,87	4,56	1,03	0,54	0,13	0
\bar{x}	2,133	3,713	4,95	7,63	4,69	2,846	1,9833	0,5567	0,15	0,363
SD	0,49	1,04	1,80	1,91	1,65	1,48	1,14	0,12	0,02	0,63
SEM	0,22	0,47	0,81	0,85	0,74	0,66	0,51	0,05	0,01	0,28

4. Ekspresi mRNA *Cygb* relatif terhadap kontrol (rumus livak) dari hari ke 1-30 data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA <i>Cygb</i> relatif terhadap kontrol (rumus livak)									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	11,02	10,23	14,04	16,84	13,56	13,84	10,32	11,25	7,86	7,12
2	9,23	11,57	12,12	13,22	17,12	12,11	12,45	10,43	9,54	9,34
3	8,18	13,02	10,39	11,43	10,91	13,22	9,72	9,03	10,85	9,13
\bar{x}	9,476 6667	11,606 667	12,183 333	13,83	13,863 333	13,056 667	10,83	10,236 667	9,4166 6667	8,53
SD	1,44	1,40	1,83	2,76	3,12	0,88	1,43	1,12	1,50	1,23
SEM	0,64	0,62	0,82	1,23	1,39	0,39	0,64	0,50	0,67	0,55

5. Ekspresi mRNA *PGC-1 α* relatif terhadap kontrol (rumus livak) dari hari ke 1-30 data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA <i>PGC 1α</i> relatif terhadap kontrol (rumus livak)									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	0,72	5,21	3,08	3,08	2,02	2,08	1,62	2,02	0,93	1,08
2	0,48	4,32	5,98	2,78	1,05	1,35	1,58	1,07	1,02	1,62
3	0,31	4,22	5,58	1,45	4,06	0,96	0,32	0,86	1,38	0,84
\bar{x}	0,503 3333	4,583 3333	4,88	2,4366 667	2,37 666 67	1,463 3333	1,173 3333	1,3166 667	1,11	1,18
SD	0,21	0,55	1,57	0,87	1,54	0,57	0,74	0,62	0,24	0,40
SEM	0,09	0,24	0,70	0,39	0,69	0,25	0,33	0,28	0,11	0,18

6. Ekspresi mRNA *MnSOD* relatif terhadap kontrol (rumus livak) dari hari ke 1-30 data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA <i>MnSOD</i> relatif terhadap kontrol (rumus livak)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	0,87	1,45	1,82	2,35	0,28	0,62	0,76	0,54	0,31	0,28
2	0,62	0,78	1,36	1,78	0,42	0,56	0,54	0,45	0,23	0,32
3	1,32	1,08	1,24	2,48	0,32	0,85	0,62	0,53	0,28	0,23
\bar{x}	0,9366 67	1,103 333	1,473 333	2,2033 33	0,34	0,676 667	0,64	0,5066 67	0,2733 33	0,2766 67
SD	0,35	0,34	0,31	0,37	0,07	0,15	0,11	0,05	0,04	0,05
SEM	0,16	0,15	0,14	0,17	0,03	0,07	0,05	0,02	0,02	0,02

7. Data Presentasi proporsi imunoratio Analisis Imunohistokimia (%)

Protein HIF 1 α

Pengulangan	Presentasi Proporsi Imunoratio (%)									
	Hari ke									
	1	3	5	7	10	13	17	21	25	30
1	80,4	70,2	7,3	0	15,1	7,7	0	5,3	0	0
2	65,9	85,8	37,6	0	15,5	17,8	0	2,3	0	0
3	59,1	81,7	34,9	24,9	7,9	0	0	0	0	0
4	59,4	84,7	25,9	28,7	5,44	0	19,5	0	4,2	0
5	28,5	91,6	33,4	37,3	1,54	0	4,3	0	0	2,4
X	58,66	82,8	27,82	18,18	9,096	5,1	4,76	1,52	0,84	0,48
SD	18,94	7,91	12,26	17,19	6,10	7,84	8,45	2,34	1,88	1,07
SEM	8,47	3,54	5,48	7,69	2,73	3,51	3,78	1,04	0,84	0,48

Protein HIF- 2 α

Pengulangan	Presentasi Proporsi Imunoratio (%)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	49,2	70,5	90,5	97	100	21,8	56,4	19,6	0	8,5
2	26,8	82,1	68,2	94	78,4	89,8	23,8	9,3	17,4	2,3
3	48,2	57	97,8	99,3	95,3	67,4	52,6	35,8	14	0
4	21,3	53,4	64,5	79,7	99,6	85,4	49,6	28,4	12,4	0
5	57,7	84,1	89,4	100	70,4	54,8	34,9	17,4	0	0
x	40,64	69,42	82,08	94	88,74	63,84	43,46	22,1	8,76	2,16
SD	15,71	14,04	14,78	8,33	13,52	27,39	13,68	10,24	8,20	3,68
SEM	7,03	6,28	6,61	3,73	6,05	12,25	6,12	4,58	3,67	1,65

Protein Cygb

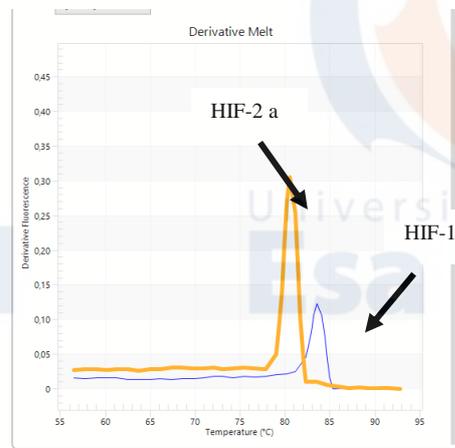
Pengulangan	Presentasi Proporsi Imunoratio (%)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	78,2	78,3	96,3	96,9	94	76,8	62,7	61,3	25,3	27,4
2	70,2	97,2	100	91,6	85,5	78,5	74,3	75,8	85,8	64,8
3	46,6	88,4	84,7	98,7	100	84,2	67,2	74,2	60,5	52,9
4	45,2	90,6	74,9	100	86,1	76,3	83,2	68,6	54,8	43,8
5	85,4	80,4	92,6	85,1	100	90,5	88,5	65,8	59,4	60,2
x	65,12	86,98	89,7	94,46	93,12	81,26	75,18	69,14	57,16	49,82
SD	18,36	7,72	10,03	6,13	7,12	6,04	10,75	5,98	21,55	14,84
SEM	8,21	3,45	4,48	2,74	3,18	2,70	4,81	2,67	9,64	6,64

8. Lampiran 4. Uji Normalitas Data Dan Uji Varians

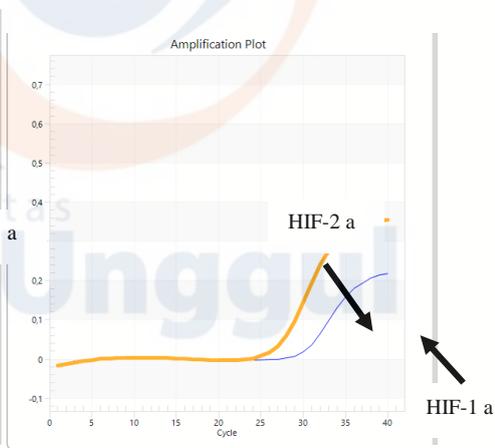
Uji statistik	Panjang ekor	mRNA HIF -1 α	mRNA HIF-2 α	mRNA Cygb	mRNA PGC-1 α	mRNA MnSOD	proporsi HIF1- α	proporsi HIF2- α	proporsi Cygb
Uji Kolmogoro v Smirnov Sig	0,004	0,000	0,200	0,200	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000
Uji normalitas Hasil transformasi data	0,038	0,001	-	-	0,200	0,200	0,000	0,000	0,000
Uji ANOVA Sig	-	-	0,000	0,000	0,000	0,000	-	-	-
Uji non parametrik Kruskal Wallis	0,05	0,05	-	-	-	-	0,043	0,043	0,239

9. Lampiran 6 Grafik Melting Curve dan amplifikasi plot gen HIF-1 α

Melting Curve



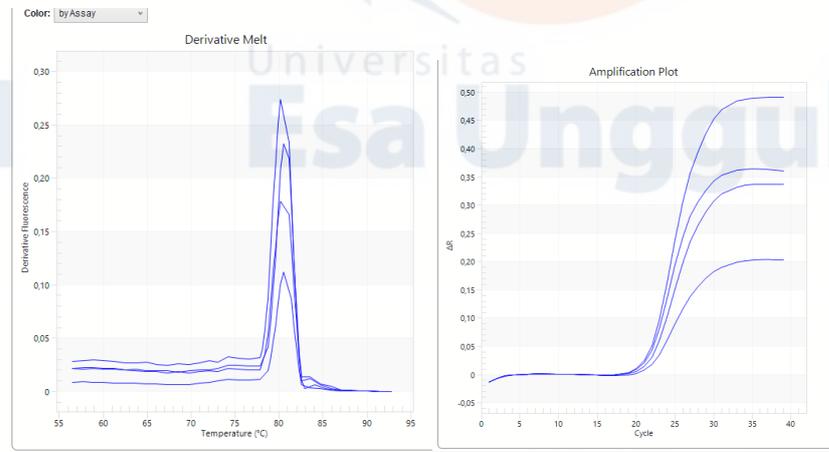
Amplification Plot



] gen HIF-2 α

Melting Curve

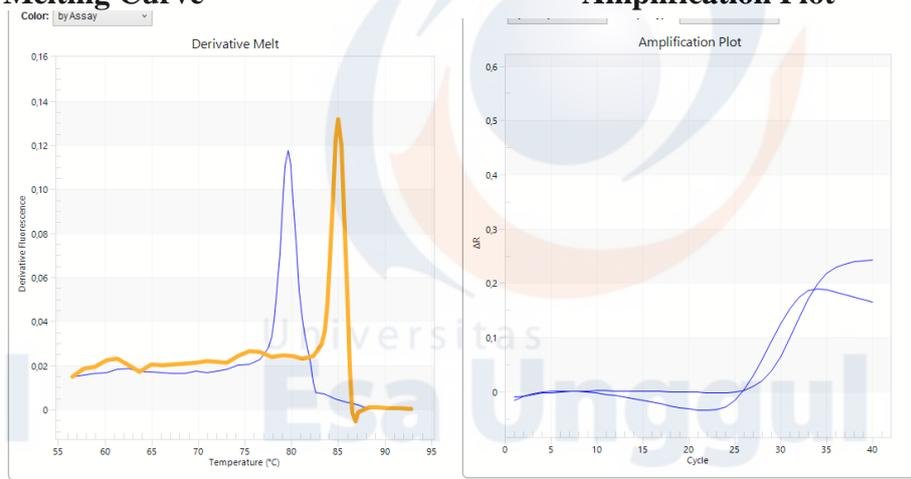
Amplification Plot



gen Cygb dan 18S rRNA

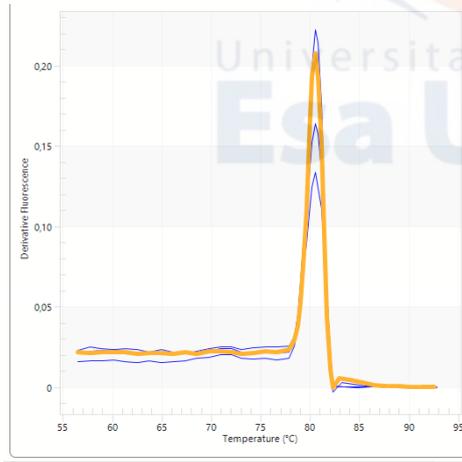
Melting Curve

Amplification Plot



gen PGC-1 α

Melting Curve

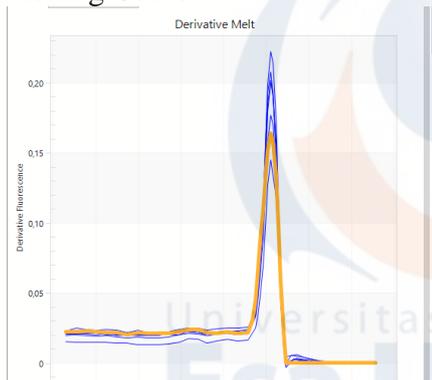


Amplification Plot

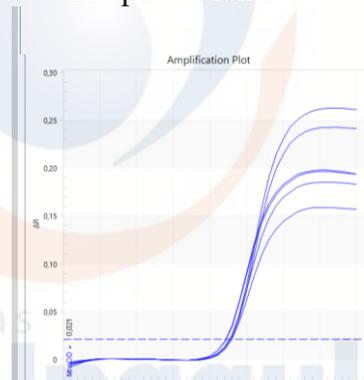


gen MnSOD

Melting Curve



Amplification Plot



10. Data Kuantitatif analisis sediaan histologi dengan perangkat lunak ImageJ

Data rata-rata ketebalan epidermis (mm)

Rata-rata ketebalan epidermis (mm) pada jaringan regenerasi ekor cecak mRNA dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Rata-rata ketebalan epidermis (mm)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	27,899	23,037	23,52 5	62,454	61,55 7	72,24 0	84,99 9	83,285	63,772	91,685
2	19,347	20,661	33,79 9	38,283	83,30 7	72,33 3	65,89 5	94,667	148,86 2	131,37 8
3	5,812	16,554	22,86 2	31,904	51,75 6	33,42 7	87,43 1	85,167	98,153	113,54 7
4	18,380	21,765	15,34 3	44,054	27,18 9	68,90 5	67,97 0	114,65 9	106,28 7	141,94 4
5	16,440	22,444	30,99 7	38,442	59,81 3	61,17 9	99,75 3	91,888	123,58 6	111,62 1
\bar{x}	17,576	20,892	25,30 5	43,027	56,72 4	61,61 7	81,21 0	93,933	108,13 2	118,03 5
SD	7,906	2,580	7,295	11,680	20,22 7	16,39 8	14,20 1	12,495	31,498	19,398
SEM	3,535	1,154	3,262	5,223	9,045	7333, 70	6,351	5587,9 8	14,086	8,675

Data rata-rata ketebalan dermis (mm)

Rata-rata ketebalan dermis (μm) pada jaringan regenerasi ekor cecak mRNA dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Rata-rata ketebalan dermis (mm)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	60,850	107,1 24	89,28 9	140,27 7	128,4 53	187,5 04	184,1 64	172,27 5	164,40 5	194,68 6
2	40,836	88,78 3	166,7 25	118,68 5	183,1 86	139,7 76	163,3 07	181,34 0	180,73 6	210,68 1
3	41,100	107,1 60	81,84 3	127,68 2	99,72 9	166,7 92	161,7 17	185,61 2	198,14 1	124,34 7
	77,964	92,11 0	136,6 35	123,01 8	181,5 3	141,9 09	181,7 96	186,24 5	182,48 0	169,61 8
	46,499	88,91 3	156,9 27	153,11 0	112,6 64	196,3 31	177,2 49	167,23 8	185,33 8	251,77 1
\bar{x}	53,450	96,81 8	126,2 84	132,55 4	141,1 17	166,4 62	173,6 47	178,54 2	182,22 0	190,22 1
SD	15,934	9,518	3,881	14,046	3901 2,14	25,73 9	10,47 8	8,429	12,071	47,409
SEM	7,126	4,256	1,735	6,281	17,44 6	11,51	4,686	3,769	5,398	21,202

Data rata-rata luas tulang rawan (mm^2)

Rata-rata luas tulang rawan *matang* (mm^2) pada jaringan regenerasi ekor cecak mRNA dari hari ke 1-30

data berdistribusi tidak normal $p < 0,05$

Pengulangan	Luas Tulang Rawan <i>matang</i> (mm^2)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	60,567	111,17	149,433	197,387	229,496	313,627	356,495	371,281	1.295,765	1.543,316
2	57,987	121,562	120,675	188,675	210,678	330,867	367,97	351,987	1.375,867	1.670,564
3	65,789	89,762	152,973	210,876	225,897	295,907	331,654	406,867	997,679	1.345,187
\bar{x}	61	107	141	199	222	313	352	377	1.223	1.520
SD	3,97	16,21	17,71	11,19	9,99	17,48	18,56	27,84	199,29	163,97
SEM	1,78	7,25	7,92	5,00	4,47	7,82	8,30	12,45	89,12	73,33

Data rata-rata luas tulang rawan (mm^2)

Rata-rata luas tulang rawan belum matang (mm^2) pada jaringan regenerasi ekor cecak mRNA dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi tidak normal $p < 0,05$

Pengulangan	Luas Tulang Rawan <i>immatur</i> (mm^2)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	2,443243	89,762872	152,973654	210,87624	225,897209	295,9097453	331,654187	408,867932	997,679405	1345,187056
2	2,534092	94,630713	146,870387	180,296189	217,340186	305,865327	367,075954	432,651956	1028,209732	1192,278065
3	1,934756	76,657497	157,903808	231,265395	231,497348	286,186043	310,543905	387,654045	896,765039	1512,386045
\bar{x}	2,304030333	87,01702733	152,5826163	207,4792747	224,911581	295,9870384	336,424682	409,7246443	974,2180587	1268,732561
SD	0,37	40,60	72,47	103,38	110,38	144,31	165,71	199,48	446,10	694,39
SEM	0,17	18,16	32,41	46,23	49,36	64,54	74,11	89,21	199,50	310,54

Data rata-rata jumlah sel mirip fibroblast ($/\text{mm}^2$)

Rata-rata jumlah sel mirip fibroblast (/mm²) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Jumlah sel mirip fibroblast/mm ²									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	41	97	82	140	112	207	153	197	127	134
2	60	102	61	64	142	168	133	169	114	124
3	58	68	110	131	134	122	166	125	187	196
4	46	67	144	70	126	55	141	119	118	128
5	36	64	71	105	138	103	72	70	144	142
\bar{x}	48	79,6	93,6	102	130,4	131	133	136	138	144,8
SD	10,50	18,3	33,6	34,50	11,8	58,7	36,3	48,93	29,72	29,41
SEM	4,69	8,19	15,0	15,43	5,31	26,2	16,2	21,88	13,29	13,15

Data rata-rata jumlah sel saraf (/mm²)

Rata-rata jumlah sel saraf dalam satu luas bidang pengamatan pada jaringan regenerasi ekor cecak mRNA dari hari ke 1-30 (Mean \pm SEM) data berdistribusi normal $p > 0,05$

Pengulangan	Jumlah sel saraf (/mm ²)									
	Hari ke									
	1	3	5	8	10	13	17	21	25	30
1	3	5	7	21	40	37	34	69	84	16
2	6	7	55	25	52	35	43	38	43	14
3	9	17	35	35	36	45	38	72	71	7
4	4	25	7	27	42	36	86	96	72	15
5	6	7	0	21	44	92	56	42	61	17
\bar{x}	5,6	12,2	20,8	25,8	42,8	49	51,4	63,4	66,2	
SD	2,30	8,56	23,3	5,76	5,93	24,3	21,0	23,83	15,32	3,96
SEM	4,69	8,19	15,0	15,43	5,31	26,2	16,2	21,88	13,29	13,15

12. Data Hasil Blast similaritas gen antar spesies, contoh pada

Gen HIF-1 α dengan menggunakan *Gecko Japonicus*

PREDICTED: *Gecko japonicus* hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A), transcript variant X2, mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_015422025.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS XM_015422025 4488 bp mRNA linear VRT 20-JAN-2016
 DEFINITION PREDICTED: *Gecko japonicus* hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A), transcript variant X2, mRNA.
 ACCESSION XM_015422025
 VERSION XM_015422025.1
 DBLINK BioProject: [PRJNA308133](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE *Gecko japonicus*
 ORGANISM [Gecko japonicus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Lepidosauria; Squamata; Bifurcata; Gekkota; Gekkonidae; Gekkoninae; *Gecko*.
 COMMENT **MODEL REFSEQ:** This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence ([NW_015173127.1](#)) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by EST evidence.
 Also see:

[Documentation](#) of NCBI's Annotation Process

```
##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider      :: NCBI
Annotation Status       :: Full annotation
Annotation Version      :: Gecko japonicus Annotation Release 100
Annotation Pipeline     :: NCBI eukaryotic genome annotation
Annotation Software Version :: 6.5
Annotation Method       :: Best-placed RefSeq; Gnomon
Features Annotated      :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
##Genome-Annotation-Data-END##
```

FEATURES

source
 Location/Qualifiers
 1..4488
 /organism="Gecko japonicus"
 /mol_type="mRNA"
 /isolate="JY-2015"
 /isolation_source="soil"
 /db_xref="taxon:146911"
 /chromosome="Unknown"
 /sex="male"
 /country="China: Nantong, Jiangsu province"
 /lat_lon="32.0081632006784 N 120.91830571875062 E"
 /collection_date="2009-10-25"
 1..4488
 /gene="HIF1A"
 /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence includes similarity to: 1 EST, 4 Proteins, and 100% coverage of the annotated genomic feature by RNAseq alignments, including 4 samples with support for all annotated introns"
 /db_xref="GeneID:107119536"

CDS
 115..2550
 /gene="HIF1A"
 /codon_start=1
 /product="hypoxia-inducible factor 1-alpha isoform X2"
 /protein_id="XP_015277511.1"
 /db_xref="GeneID:107119536"
 /translation="MDSDATGGASDKKRISERRKEKSRDAARCRRSKESQVFYELAHQLPLPHVSAHLKASIMRLTISYLRMRKLLDADDEAEAEAMETQLNCFYALKALDGFV MVLSEGDGMVYHSENVNKCMLTQFELTGHVDFDTHPCDHEELREMLTHRNGPVKKGKEQNTERSFFLRMKCTLSRGRVNIKSATIKVLHCTGHIRIYDSCSSQTVCGYQPEPMTCLVLICEPIPHPSNIEVPLDSKTFLSRHSLSMKFSYCDERITELMGYDPEELLGRS LKPSQALRSPVLRITLHNFYKQVETQVYMLKSGQANMTEQATYVNTKNSG"

BLAST » **blastn suite** » RID-KV29AKGW015 Home Recent Results Saved Strategies H

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#) [YouTube](#) [How to read this page](#) [Blast report desc](#)

Job title: ref|XM_015422025.1| (4488 letters)

RID: KV29AKGW015 (Expires on 07-06 10:57 am)

Query ID: XM_015422025.1

Description: PREDICTED: Gekko japonicus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), transcript variant X2, mRNA

Molecule type: nucleic acid

Query Length: 4488

Database Name: nr

Description: Nucleotide collection (nt)

Program: BLASTN 2.8.0+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 200 Blast hits on 100 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments

Sequences producing significant alignments:

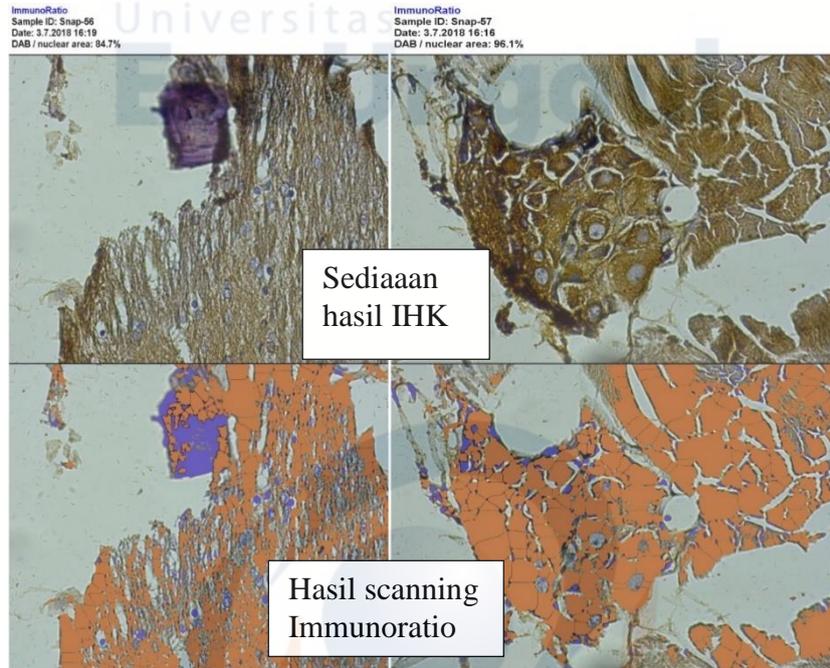
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Gekko japonicus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), transcript variant X2, mRNA	8288	8288	100%	0.0	100%	XM_015422025.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Gekko japonicus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), transcript variant X1, mRNA	5016	8291	100%	0.0	100%	XM_015422024.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pogona vitticeps hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (HIF1A), transcript variant X1, mRNA	2220	2220	57%	0.0	82%	XM_020813439.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pogona vitticeps hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (HIF1A), transcript variant X2, mRNA	2191	2191	57%	0.0	82%	XM_020813441.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Anolis carolinensis hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), transcript variant X1, mRNA	2183	2536	71%	0.0	82%	XM_008123046.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Anolis carolinensis hypoxia inducible factor 1 alpha subunit (hif1a), transcript variant X2, mRNA	2169	2522	71%	0.0	82%	XM_008123569.2
<input type="checkbox"/> Phrynocephalus przewalskii hypoxia-inducible factor 1a (HIF1a) mRNA, complete cds	2109	2109	57%	0.0	81%	KP696482.1
<input type="checkbox"/> Phrynocephalus erythrurus hypoxia-inducible factor 1a (HIF1a) mRNA, complete cds	2106	2106	57%	0.0	81%	KP696483.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Python bivittatus hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF1A), mRNA	1419	1648	43%	0.0	81%	XM_007427209.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Calidris pugnax hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), mRNA	1327	1416	39%	0.0	81%	XM_014966597.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Colinus striatus hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), mRNA	1319	1537	48%	0.0	81%	XM_010199138.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sturnus vulgaris hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), mRNA	1306	1515	48%	0.0	80%	XM_014871372.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Zonotrichia albicollis hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor), (HIF1A), mRNA	1301	1515	48%	0.0	80%	XM_014270297.1

12. Hasil penghitungan semi kuantitatif *scanning* dengan perangkat lunak *Immunoratio*

Hasil Scanning Immunoratio Protein HIF-1 α



Hasil Scanning Immunoratio Protein HIF-2 α

Lampiran 10 Korelasi antar variabel

Variabel	mRNA HIF	mRNA HIF2	mRNA Cygb	Protein HIF 1 α	Protein HIF 2 α	Protein Cygb	mRNA PGC-1 α	mRNA MnSOD
mRNA HIF-1 α				0,685				0,542
mRNA HIF-2 α			0,706		0,868	0,769	0,728	0,705
mRNA Cygb		0,706			0,697	0,804		
mRNA PGC-1 α		0,728		0,416	0,739			
mRNA MnSOD	0,542	0,705		0,479	0,499			
Protein HIF 1 α	0,685						0,416	0,479
Protein HIF 2 α		0,868	0,697			0,877	0,739	0,499
Protein Cygb		0,769	0,804		0,877			
panjang ekor	-0,807	-0,661	-0,465	-0,853	-0,754	-0,608	-0,590	-0,492
tebal epidermis	-0,761	-0,582		-0,859	-0,64	-0,501		
tebal dermis	-0,690			-0,751	-0,495	-0,404		
luas tulang rawan matang	-0,766	-0,562		-0,840	-0,646	-0,517		
luas tulang belum matang	-0,789	-0,551		-0,847	-0,644	-0,519		
densitas sel fibroblast	-0,588			-0,659				
jumlah sel saraf	-0,789			-0,0778	-0,0543			

Keterangan :

 : tidak dilakukan uji korelasi

 : tidak ada korelasi

DAFTAR SINGKATAN

ANRT : *Aryl Hydrocarbon Reseptor Nuclear Translocator*⁸
 bHLH : *basic Helix Loop Helix*^{8,10}
 Ct : *Cycle treshold*³⁴
 Cygb: Sitoglobin³
 Cyt : Sitokrom¹⁵
 EPAS : *Endothelial Part Arnt Sim Domain Protein*¹⁰
 Epo : *Erythropoetin*³
 FLT : *Fms Like Tyrosine Kinase*⁹
 Hb : Hemoglobin¹²
 HE : *Hematoxylin Eosin*³⁰
 HIF : *Hypoxia Inducible Faktor*^{3,7,9}
 HLF : *HIF Like Faktor*¹⁰
 HRE : *Hypoxia Responsive Element*^{9,10}
 HRF : *HIF Release Faktor*¹⁰
 IGF : *Insulin like Growth Faktor*⁹
 IGFBP : *Insulin like Growth Faktir Bindiung Protein*⁹
 Kda : Kilo Dalton⁷¹
 KGF : *Keratinocyte Growth Faktor*²⁰
 Mb : Mioglobin¹¹
 MHC : *Myosin Heavy Chain*²⁵
 MnSOD : Mangan Superoksida dismuatse¹⁴
 MOP : *Member of PAS*¹⁰
 mtFA : *mitochondrial trancription faktor*¹⁷
 NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide*¹⁵
 NGF : *Nerve Growth Faktor*²⁴
 MPCs : *Myogenic Basal lamina Cells*^{2,19}
 NFW : *Nuclease Free Water*³²
 Ngb : Neuroglobin¹¹
 NO : *Nitric Oxide*^{2,14,19}
 PAS : *Per-Arnt-Sim*⁸
 PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*⁹
 PHD : *Prolyl Hydroxilase*⁸
 PMN : *Polymorphonuclear*¹⁹
 ROS : *Reactive Oksigen Species*^{3,4,13}
 RT qPCR : *Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction*³⁴
 SCs : *Satellite Cells*²
 TGF : *Transforming Growth Faktor*⁹
 TGF : *Tumor Growth Faktor*^{3,19}
 VEGF : *Vascular EndothelialGrowth Faktor*^{3,9}
 VHL : *Von Hippel Lindau Tumor*⁸

