

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 307/Kedokteran Dasar{Biomedis}

**LAPORAN
PENELITIAN INTERNAL**



**EKSPRESI GEN SITOGLOBIN PADA FASE WOUND HEALING
PROSES REGENERASI JARINGAN**

Dr. Titta Novianti., S.Si., M.Biomed.

NIDN 0318116801

UNIVERSITAS ESA UNGGUL

November 2018

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN INTERNAL

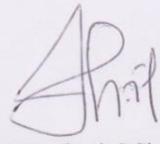
Judul Penelitian : Ekspresi Gen Sitogloblin Pada Fase *Wound Healing*
Proses Regenerasi Jaringan
Kode>Nama Rumpun Ilmu : 307/Kedokteran Dasar (Biomedis)
Peneliti
a. Nama Lengkap : Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.
b. NIDN : 0318116801
c. Jabatan Fungsional : Asisten Ahli
d. Program Studi : Bioteknologi
e. Nomor HP : 08568942269
f. Alamat surel (e mail) : titta@esaunggul.ac.id
g. NIM : 1306363456
h. Semester ke :
Anggota peneliti : -
Biaya yang diusulkan : Rp. 15.000.000 (*lima belas juta rupiah*)

Jakarta, 10 November 2018

Mengetahui,
Dekan/Ketua

Ketua Peneliti


(Dr. Aprillita Rina Yanti Eff., M.Biomed., Apt.)
NIK. 215020572


(Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.)
NIK 215050590

Menyetujui,
Wakil Rektor 1/Ketua Lembaga Penelitian,


(Roesfiansjah Rasjedin, MT., Ph.D.)
NIK. 201050167

Judul Penelitian : Ekspresi Gen Sitogloblin Pada Fase Wound Healing Proses Regenerasi Jaringan

1. Peneliti :

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1	Titta Novianti	Peneliti	Biologi Molekuler	Universitas Esa Unggul	20 jam

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Material : Hewan cecak (*Hemidactylus Platyurus*), Software Bioinformatika , website www.ncbi , kit real time PCR, primer gen cytoglobin
Segi penelitian : Biologi Molekuler

4. Masa Pelaksanaan

Mulai : bulan: Januari tahun: 2018

Berakhir : bulan: Juni tahun: 2018

5. Usulan Biaya : Rp . 15.000.000,-

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan) : Laboratorium Terpadu FIKES Universitas Esa Unggul, LIPI Zoologi

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

LIPI Zoologi : Tempat pemeliharaan dan perlakuan hewan cecak

8. Temuan yang ditargetkan :

Target temuan adalah ekspresi gen Cygb pada fase woud healing (penyembuhan luka) pada proses regenerasi jaringan

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu

Peranan gen Cygb dalam proses regenerasi jaringan, sebagai dasar dalam terapi penyembuhan luka

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala ilmiah bereputasi internasional dan atau nasional terakreditasi serta tahun rencana publikasi)

Jurnal ilmiah : **Journal Hayati**

Country : Indonesia

Reputasi : Internasional terakreditasi

Tahun rencana publikasi : 2019

11. Kegiatan pertemuan ilmiah (internasional dan atau nasional) yang ditargetkan serta tahun rencana pelaksanaan :

1. International Conference Biology di Surabaya tahun 2019

2. Seminar Nasional Regenerasi Jaringan di Jakarta tahun 2019

12. Rencana luaran :

1. HKI : ekspresi gen Cytogloblin pada fase wound healing 2019

2. buku ajar “regenerasi jaringan” tahun 2019



DAFTAR ISI

	Hal
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	1
DAFTAR ISI	3
RINGKASAN	4
BAB 1 PENDAHULUAN	5
1.1 Latar Belakang	5
1.2 Perumusan Masalah	6
1.3 Kebaharuan Yang Ditemukan	6
1.4 Tujuan Khusus	6
1.5 Urgensi (Keutamaan) Penelitian	6
1.6 Target temuan dan kontribusinya Terhadap Ilmu Pengetahuan	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Regenerasi Jaringan	8
2.2 Hipoksia	9
2.3 Protein Sitoglobin	11
2.4 Peta jalan Penelitian	13
2.5 Kontribusi dan kebaharuan yang akan dihasilkan	13
BAB 3 METODE PENELITIAN	16
3.1 Bagan penelitian	17
BAB 4 HASIL PENELITIAN	19
4.1 Gambaran Histologi Fase Wound Healling	18
4.2 Ekspresi gen Cytoglobin	22
BAB 5 DISKUSI	23
REFERENSI	27
Lampiran	29
Lampiran 1 Surat Pernyataan Peneliti	29
Lampiran 2 Hasil qRT-PCR	30

RINGKASAN

Saat terjadi kerusakan pada jaringan pada organisma maka proses regenerasi jaringan berperan penting untuk pemulihan struktur dan fungsi jaringan. Proses regenerasi jaringan diawali dengan upaya penyembuhan luka yang terjadi pada fase awal yang disebut fase *wound healing*. Tingginya aktivitas sel pada fase *wound healing* menyebabkan jaringan mengalami keadaan hipoksia relative. Keadaan hipoksia relative dapat menstimulasi ekspresi gen sitoglobin yang diduga memiliki peran mendifusikan oksigen ke dalam mitokondria. Sitoglobin terbukti memiliki daya afinitas tinggi terhadap besi. Hasil penelitian dengan menggunakan hewan coba cecak (*Hemidactylus platyurus*) betina sebanyak 30 ekor yang memiliki daya regenerasi tinggi pada jaringan ekor, menunjukkan adanya ekspresi gen *Cygb* pada fase *wound healing*. Hasil pengamatan histologi jaringan dengan pewarnaan HE selama fase *wound healing* menunjukkan tingginya aktivitas sel. Sel basal lamina, sel saraf, sel fibroblast, dan sel leukosit berproliferasi, bermigrasi, dan berdiferensiasi dalam upaya penyembuhan luka selama fase *wound healing*. Selama fase tersebut, pembuluh darah belum terbentuk, sehingga asupan oksigen ke dalam sel berkurang. Keadaan hipoksia relative terjadi karena tingginya kebutuhan akan oksigen dan rendahnya asupan oksigen. Ekspresi gen *Cygb* reatif sangat tinggi pada hari pertama pertumbuhan jaringan ekor cecak dan mencapai puncaknya pada hari ke 8. Hasil uji Kruskal Wallis menunjukkan tidak adanya perbedaan ekspresi pada setiap hari pengamatan ($p > 0,05$) pada fase *wound healing*. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi gen *Cygb* relative stabil dan dipertahankan agar tetap tinggi selama fase *wound healing* untuk mempertahankan aktivitas sel selama fase tersebut.

Kata Kunci : fase *wound healing*, hipoksia, sitoglobin, regenerasi jaringan, diferensiasi

Universitas
Esa Unggul

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Regenerasi jaringan dalam ilmu Biologi adalah proses pembaharuan, restorasi, dan pertumbuhan yang membuat genom, sel, organisme, dan ekosistem tahan terhadap fluktuasi alam atau kejadian yang menyebabkan gangguan atau kerusakan. (1) Proses regenerasi menjadi lengkap jika jaringan baru yang terbentuk sama dengan jaringan yang hilang, sedangkan proses regenerasi tidak lengkap jika setelah terbentuk sel nekrotik, maka terbentuk jaringan fibrosis.(2) Pada dasarnya, proses regenerasi dimediasi oleh proses regulasi molekuler gen. Beberapa hewan reptil dan amfibi hanya dapat meregenerasi bagian ekor yang hilang seperti kecebong dan cecak.(3)

Sitoglobin (Cygb) merupakan senyawa berbentuk homodimer yang diikat oleh ikatan Cys-disulfida, dengan unsur heme menghadap sisi berlawanan dengan ikatan dimer.(4) Cygb terbukti memiliki daya afinitas terhadap besi untuk ikatan luar dan memiliki oksigen yang seimbang seperti halnya myoglobin (Mygb). Oleh karena itu, diduga Cygb terlibat dalam difusi oksigen menuju mitokondria. (5)

Protein Cygb menyebar pada popuasi sel, namun tidak berkaitan dengan tingginya konsumsi oksigen dan tingkat metabolisme. Hal ini menunjukkan bahwa Cygb tidak berperan pada proses difusi oksigen. Hasil yang kontradiksi telah dilaporkan, mengenai regulasi dan fungsi Cygb dalam keadaan hipoksia. Perubahan signifikan ekspresi Cygb pada jaringan kortikal otak setelah mengalami hipoksia berkelanjutan atau pada saat terapi hipoksia.(6) Kadar mRNA Cygb meningkat saat hipoksia. Secara kontras, hasil sebelumnya telah melaporkan bahwa tingkat mRNA dan protein Cygb tidak berubah secara signifikan di otak, meskipun di bawah kondisi hipoksia berkelanjutan atau intermiten.(7)

Hasil penelitian tentang fungsi Cygb dalam keadaan hipoksia, menemukan bahwa Cygb yang diatur dalam *cell line* glioblastoma manusia yang beraneka ragam dan jaringan tumor manusia, mengimplikasikan bahwa Cygb mungkin sebagian berkontribusi pada mekanisme pertahanan dan memungkinkan sel-sel kanker untuk bertahan hidup dalam keadaan hipoksia. (8)Sebuah analisis sebelumnya tentang ekspresi Cygb pada otak tikus dewasa dalam keadaan hipoksia kronis, paparan hipoksia menunjukkan terjadinya peningkatan Cygb pada tingkat transkripsi di daerah otak

sebagai respon terhadap stres oksidatif. Hal ini menunjukkan bahwa *Cygb* dapat berfungsi di sitoproteksi dan metabolik / homeostasis kardiovaskular. (9)

1.2 Perumusan Masalah

Regenerasi jaringan merupakan proses rumit yang melibatkan berbagai sel, gen dan protein. Pada penelitian ini akan menganalisis ekspresi gen *Cygb* pada fase *wound healing* regenerasi jaringan serta peranan gen tersebut yang belum teridentifikasi sebelumnya

1.3 Kebaharuan yang ditemukan

Eksresi gen *Cygb* pada fase *wound healing* (penyembuhan luka) serta peranan gen tersebut terhadap proses regenerasi jaringan.

1.4 Tujuan Khusus

- a. Analisis ekspresi gen *Cygb* pada fase *wound healing* pada proses regenerasi jaringan
- b. Analisis peranan gen tersebut pada fase *wound healing* pada proses regenerasi jaringan

1.5 Urgensi (keutamaan) penelitian

Urgensi penelitian ini adalah sebagai langkah awal untuk menganalisis ekspresi dan fungsi gen *Cygb* pada fase *wound healing* regenerasi jaringan, sehingga menjadi dasar dalam penelitian selanjutnya untuk menemukan metoda pemberian terapi terbaik dalam terapi regenerasi jaringan

1.6 Target temuan dan kontribusinya terhadap ilmu pengetahuan

Target temuannya analisis ekspresi gen *Cygb* serta peranannya pada fase *wound healing* proses regenerasi jaringan sehingga dapat dimanfaatkan dalam terapi luka atau kerusakan jaringan

Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran	Indikator Capaian
1	Publikasi ilmiah ¹⁾	Internasional Bereputasi
		Nasional Terakreditasi
2	Pemakalah dalam pertemuan ilmiah ²⁾	Internasional
		Nasional
3	Teknologi Tepat Guna ³⁾	tidak ada
4	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/ Rekayasa Sosial ⁴⁾	tidak ada
5	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT) ⁵⁾	2.6

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Regenerasi Jaringan

Regenerasi jaringan dalam ilmu Biologi adalah proses pembaharuan, restorasi, dan pertumbuhan yang membuat genom, sel, organisme, dan ekosistem tahan terhadap fluktuasi alam atau kejadian yang menyebabkan gangguan atau kerusakan. Setiap spesies, dari mulai bakteri sampai manusia mampu melakukan regenerasi. Proses regenerasi menjadi lengkap jika jaringan baru yang terbentuk sama dengan jaringan yang hilang, sedangkan proses regenerasi tidak lengkap jika setelah terbentuk sel nekrotik, maka terbentuk jaringan fibrosis. Pada dasarnya, proses regenerasi dimediasi oleh proses regulasi molekuler berbagai gen yang berperan dalam proses tersebut. Regenerasi dalam biologi berlandaskan proses morfogenesis organisme multiseluler untuk memperbaiki jaringan atau organ tubuhnya sehingga dapat mempertahankan sifat fisiologi dan morfologi organisme.(1)(10)

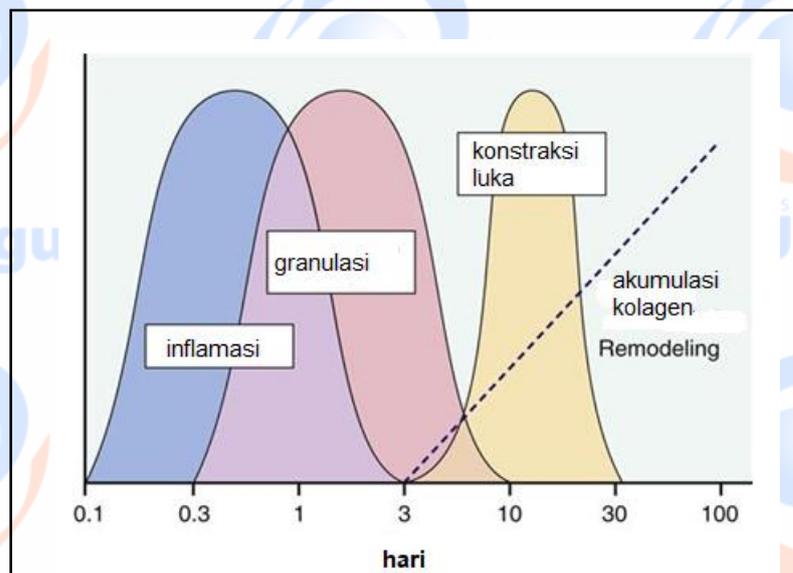
Pada dasarnya, proses regenerasi dimediasi oleh proses regulasi molekuler berbagai gen yang berperan dalam proses tersebut. Regenerasi dalam biologi berlandaskan proses morfogenesis organisme multiseluler untuk memperbaiki jaringan atau organ tubuhnya sehingga dapat mempertahankan sifat fisiologis dan morfologi organisme. (1)

Proses regenerasi terbagi dalam empat fase, yaitu fase *wound healing* (penyembuhan luka) fase blastemal, fase diferensiasi, dan fase pematangan. Fase *wound healing* meliputi inflamasi, granulasi dan rekonstruksi luka, merupakan fase awal jaringan melakukan upaya jaringan menyembuhkan luka, sehingga pada fase ini sel aktif beraktivitas. Fase blastemal merupakan fase jaringan membentuk agregat sel punca. Fase diferensiasi merupakan fase membentuk jaringan baru yang berasal dari sel punca. Fase pematangan merupakan fase jaringan memantapkan jaringannya melalui proses morfogenesis. (11)

2.2 Fase *wound healing*

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.(12)(13)(14)



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 perannya 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.(11)(14)

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. (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,(12)(15)

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.(12)(16)

Pada fase regenerasi penyembuhan luka, terjadi peningkatan proses angiogenesis atau pertumbuhan pembuluh darah baru. Peningkatan angiogenesis ini untuk memenuhi kebutuhan nutrisi dan oksigen guna mendukung proses proliferasi sel dan diferensiasi jaringan. Pada fase ini dapat menginduksi keadaan hipoksia akut yang akan menjadi sinyal penting selama fase penyembuhan luka karena keadaan hipoksia akan meregulasi proliferasi sel, migrasi sel, dan diferensiasi melalui induksi sitokin dan sinyaling sel. (17)(14)

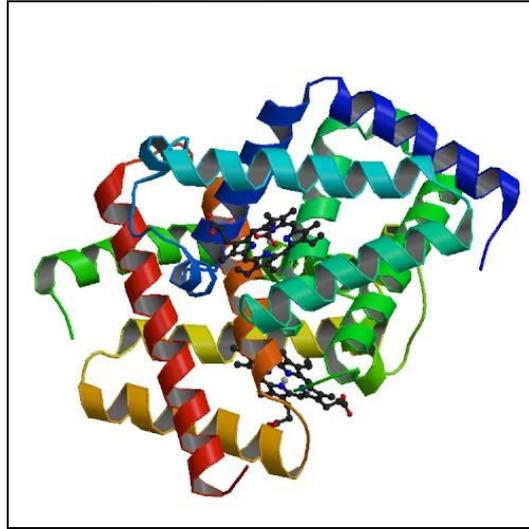
Pada fase regenerasi jaringan pembuluh darah akan memvaskularisasi hampir semua jaringan sesuai dengan kebutuhan fisiologinya. Terjadi proses angiogenesis yaitu pertumbuhan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang telah ada. Angiogenesis terutama terjadi selama perkembangan embrio dan dapat pula terjadi pada hewan

dewasa selama proses fisiologi antara lain penyembuhan luka. Angiogenesis sangat dibutuhkan untuk keberhasilan terjadinya penyembuhan luka.(14)(18)

2.3 Hipoksia dan gen Cygb

Berkurangnya kadar oksigen dalam jaringan dapat menyebabkan kejadian hipoksia dengan kadar oksigen mencapai 1 % dari keadaan normal 21 %. Hipoksia adalah keadaan rendahnya konsentrasi oksigen di dalam jaringan yang dapat mengancam kelangsungan hidup organisme. Hipoksia merupakan suatu keadaan di mana terjadi defisiensi oksigen yang mengakibatkan kerusakan jaringan akibat penurunan respirasi oksidatif aerob, akibat mengalami cedera atau luka pada jaringan. Tingkat kerusakan jaringan akan tergantung kepada tingkatan hipoksia, sel pada jaringan dapat mengalami adaptasi, cedera, atau kematian. Namun, organisme aerob, dari prokariot sampai eukariot yang kompleks, mempunyai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia baik pada tingkat sistemik maupun seluler. (19)(20)

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 2.2) dan memiliki residu globin yang bersifat lestari pada spesies mamalia, ikan, amfibi, reptil, dan burung.(21)



Gambar 2.2 Struktur protein Cygb manusia.

Terdapat 8 alfa heliks dan beberapa residu pada N terminal dan C terminal (Modifikasi dari (22))

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.(22) Hipotesis yang menarik adalah ekspresi Cygb sebagian besar terjadi pada sel-sel derivat fibroblas. Cygb pertama kali diidentifikasi pada tahun 2001 pada sel stela hati yang diisolasi dari jaringan hati tikus. Protein Cygb yang ditemukan awalnya bernama *stellate cell associated activated protein* (STAP).(23) 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.(24)

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.(24) 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.(9)

Pengetahuan tentang peranan protein Cygb terhadap regenerasi jaringan masih sangat terbatas.(25) 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.(26) 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.(27)

2.4 Cecak (*Hemidactylus platyurus*)

Cecak (*Hemidactylus platyurus*) termasuk kelas reptilia, ordo squamata, family Geckonidae dan Genus Hemidactylus, yang memiliki kemampuan regenerasi jaringan yang cukup tinggi. Regenerasi jaringan pada cecak terjadi pada ekornya yang akan mengalami autotomi untuk mempertahankan diri. Ekor yang hilang tersebut akan digantikan dengan ekor yang baru dalam waktu lebih kurang 7 hari. Proses penyembuhan luka, merupakan fase awal dalam regenerasi jaringan yang melibatkan proses peradangan atau inflamasi.(28)(29)

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.(30)

Cecak memiliki daya regenerasi tinggi pada ekor yang terputus (autotomi) dan mampu membentuk ekor baru. Autotomi adalah perilaku cecak dalam kemampuannya

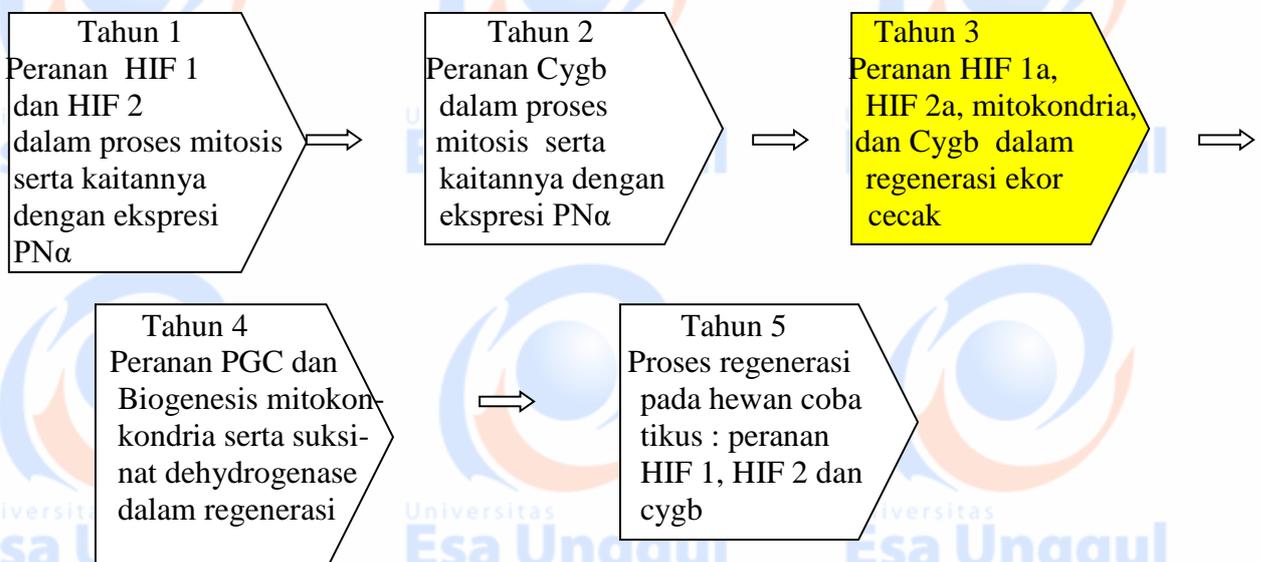
memutuskan ekor untuk mengelabui predator. Saat autotomi, cecak akan menekan ototnya di bagian tataran autotomi sehingga ekor terputus. Ekor baru yang terbentuk memiliki morfologi yang berbeda dengan ekor lama. Perbedaan ekor lama dan ekor regenerat terletak pada warna kulit, bentuk sisik, struktur saraf, dan struktur tulang ekor. Ekor regenerat memiliki ukuran panjang sedikit lebih pendek dibandingkan ekor semula.(31)(32)

Regenerasi pada ekor cecak termasuk autotomi yang terjadi karena cecak melukai bagian distal ekor atau memberikan tekanan yang menyebabkan ekor terputus di bagian distal. Regenerasi kemudian akan dilakukan cecak untuk membentuk ekor yang baru meskipun terdapat perbedaan bentuk antara ekor yang baru dengan ekor yang lama. Pembentukan struktur *columna vertebrae* pada ekor hasil regenerasi lebih sederhana sehingga berbeda dari ekor yang normal.(33)

2.5 Peta jalan penelitian

Road map penelitian tentang Kontrol Genomik dan Proteomik dalam kondisi hipoksia dan proses mitosis secara invitro pada regenerasi jaringan di Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia berlangsung selama 5 tahun dan telah berjalan pada tahun ke 3, yaitu penelitian disertasi ini. Tahun 1 dan ke 2 telah dilakukan oleh mahasiswa program Doktor ilmu Biomedik di Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Pada riset ini, dilakukan analisis peranan biogenesis mitokondria pada regenerasi ekor cecak yang merupakan rangkaian dari riset utama.

Dengan skema road map sebagai berikut :



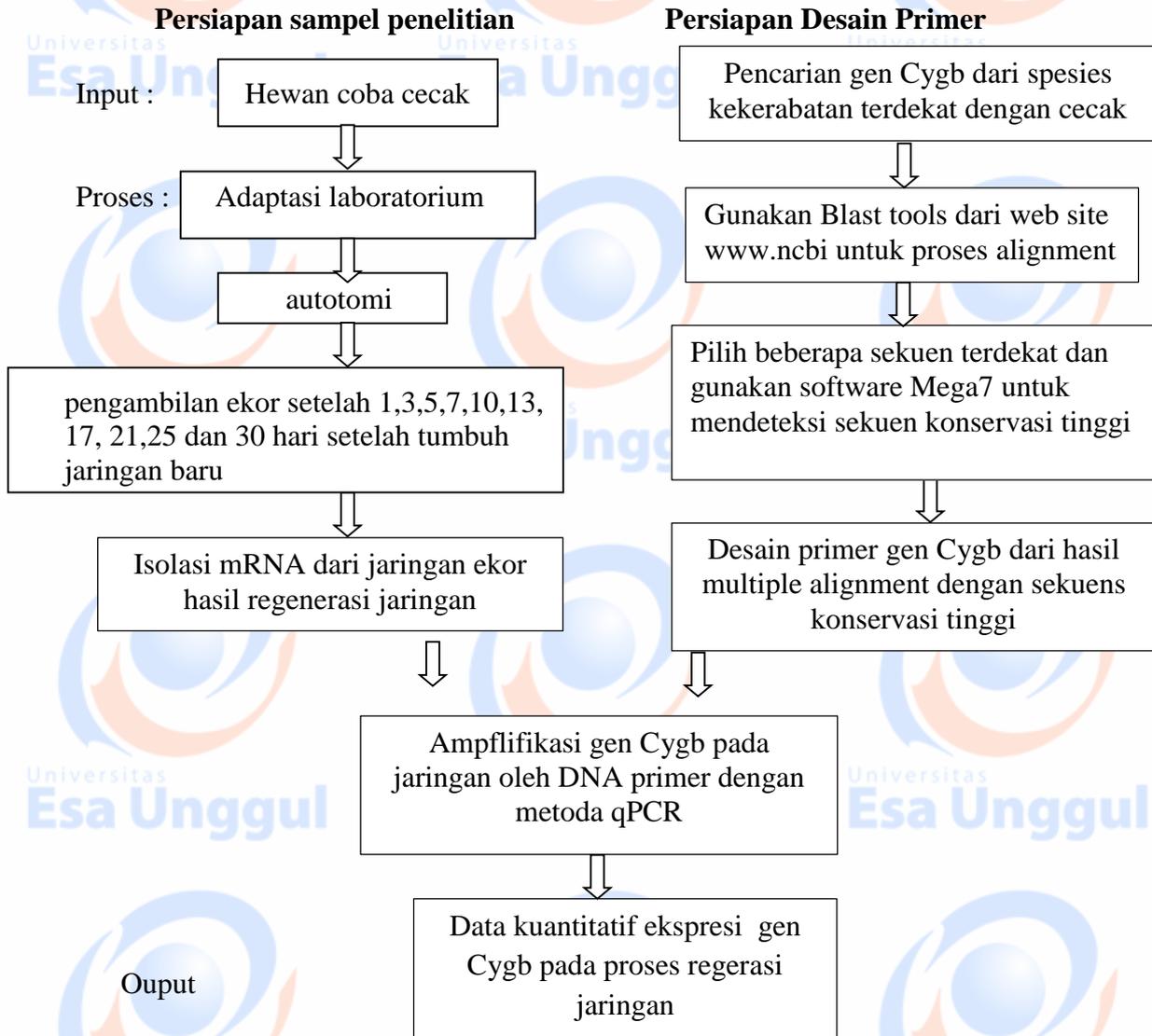
2.6 Kontribusi dan kebaruan yang akan dihasilkan

Proses regenerasi merupakan proses yang rumit karena melibatkan berbagai sel dan protein sehingga menghasilkan jaringan yang mirip seperti jaringan sebelumnya dan dapat melakukan aktivitasnya kembali. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dan kebaruan pada proses regenerasi jaringan agar lebih optimal dengan memanfaatkan dan menstimulasi gen yang diduga berperan dalam proses regenerasi jaringan. Sehingga diharapkan hasil penelitian dapat dikembangkan untuk terapi regenerasi jaringan hewan tingkat tinggi dan pada manusia.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Bagan Penelitian



3.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yaitu ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*) betina hasil regenerasi jaringan pada hari 1, hari 3, hari ke 5, hari ke 7, hari ke 10, hari ke 13 dan hari ke 17 setelah proses autotomi, kit isolasi RNA, kit qPCR, DEPC free water, Proteinase K, es batu, ethanol 70 %, Isopropanol, TE buffer, DNA primer hasil pelacakan DNA spesifik gen *Cygb*.

3.3 Metoda

3.3.1 Pelacakan gen

Pelacakan gen HIF 1a cecak merupakan gen target. Pelacakan gen *Cygb* cecak (*Hemidactylus Platyurus*), dimulai dengan pengkajian filogenetik dari literature spesies yang paling dekat kekerabatannya. Diperoleh spesies *Gecko Japonicus*, maka Gen *Cygb* dari *Gecko Japonicus* dianalisis dengan metoda BLAST untuk menemukan sekuen gen *Cygb* dari spesies lainya. Dalam penentuan daerah-daerah terkonservasi digunakan software Mega7 dengan teknik ClustalX. Urutan basa disejajarkan dengan Program ClustalX untuk kemudian dipilih yang memiliki kemiripan lebih dalam basa penyusunnya. Hal tersebut dipilih untuk dasar pelacakan penempelan primer. Dilakukan analisis penentuan DNA primer dengan software Primer3, dan dipilih secara manual daerah yang memiliki konservasi tinggi dengan mempertimbangkan daerah tersebut adalah daerah coding sequence, dan memiliki parameter umum, antara lain jumlah nukleotida, kandungan GC dan tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplemen antara basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

3.3.2 Proses isolasi RNA

Ekor hasil regenerasi jaringan pada pertumbuhan hari ke 1, 3 dan 5 sebagai sampel yang akan dilakukan isolasi RNA, dihancurkan sampai halus untuk memecah membran sel secara mekanik. Ditambahkan proteinase K 1 ul dan cell lisis sebanyak 300 ul. Suspensi diinkubasi pada suhu 65⁰C selama 15 menit dan setiap 5 menit divortex. Suspensi kemudian ditambahkan MPC175 ul, disenrifugasi pada suhu -4⁰ C selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Pisahkan supernatant dan tambahkan supernatant dengan isopropanol 500 ul, homogenkan. Larutan supernatant disentrifugasi

kembali selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Maka akan tampak RNA total pada bagian bawah tabung. Buang supernatant, bersihkan RNA dengan ehanol 70 % dua kali dan simpan dalam E buffer sebanyak 35 ul, dilakukan pengukuran konsentrasi RNA dengan nanodrop varioscan serta Pengujian Integritas RNA Total sebanyak 2ul sampel RNA total yang terisolasi dikuantifikasi dan dinilai kemurniannya menggunakan spektrofotometri nanodrop. Blanko yang digunakan pada spektrofotometri nanodrop adalah nuclease free water. Kemurnian RNA dinilai dari perbandingan absorbansi pada panjang gelombang (λ) 260 . Sampel disimpan pada lemari pendingin suhu -4° C.

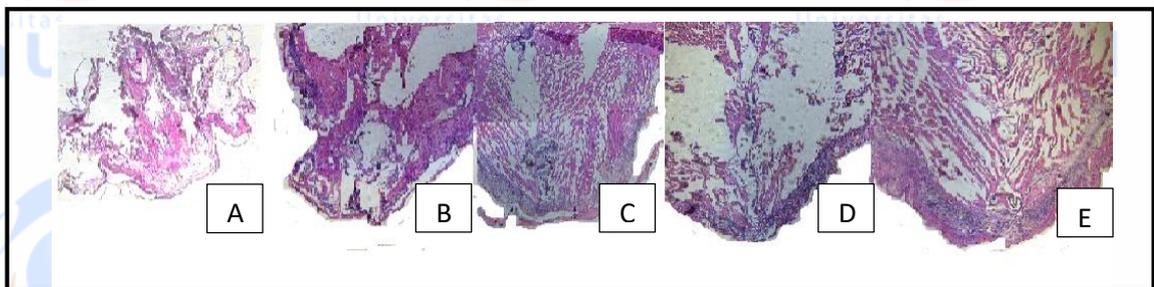
3.3.3 Ekspresi gen qPCR

Dilakukan pengenceran hasil isolasi RNA dengan konsentrasi 10 ng/ul menggunakan TE buffer. Larutan mix Kit qPCR dari merck Kappa sebanyak 10 μ l untuk setiap sampel dengan komposisi 2x Kappa sebanyak 5 μ l, Forward DNA primer sebanyak 0,2 μ l, Reverse DNA Primer sebanyak 0, 2 μ l dan 5x kappa sebanyak 0,2 μ l, sampel RNA sebanyak 2 μ l dan DEPF FW sebanyak 2, 4 μ l. Digunakan sampel control dan *house keeping gene* (18S) sebagai pembanding pada hasil kuanifikasi relative jumlah amplifikasi yang dihasilkan. Dilakukan amplifikasi gen dengan machine Real time PCR max type sebanyak 40 siklus dan perpendaran hasil ampifikasi dengan cyber green fluoresensi. Hasil amplifikasi menunjukkan kuantitas jumlah Double standed DNA yang terbentuk. Data yang diperoleh dari real-time RT-PCR (qPCR) berupa nilai threshold cycle (CT). Nilai Δ CT dihitung dengan cara pengurangan nilai CT 18S rRNA dengan nilai CT gen HIF 1 alpha. Nilai Δ CT antar kelompok dibandingkan secara deskriptif (Dietrich et al., 2011). Data hasil elektroforesis dianalisa secara deskriptif.

BAB 4. HASIL PENELITIAN

4.1 Pertumbuhan Panjang Ekor cecak

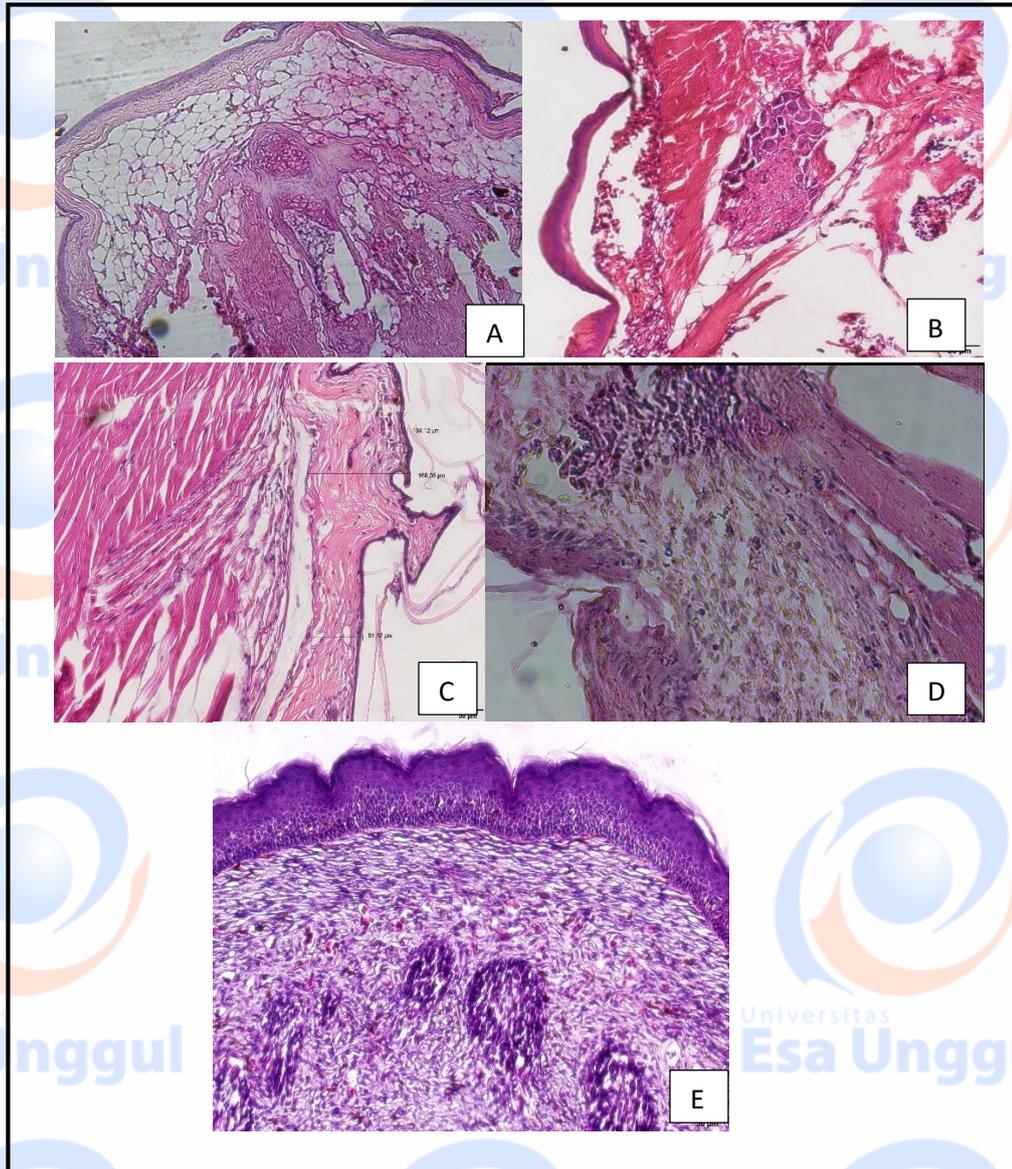
Hasil pertumbuhan panjang ekor cecak tampak pada gambar 4.1. Pada Gambar 4.1, tampak bahwa pertumbuhan panjang ekor berlangsung secara lambat dari hari ke 1 sampai hari ke 10 setelah autotomi. Pertumbuhan jaringan tampak bertambah dari hari ke 1 setelah autotomy dengan adanya proliferasi, migrasi sel, dan diferensiasi sel. Pertumbuhan jaringan dari hari ke 1 sampai hari ke 10 setelah autotomy ini tidak berbeda secara signifikan ($p > 0,05$).



Gambar 4.1 Pertumbuhan panjang ekor cecak dari hari ke 1- 10 setelah autotomi pada fase *wound healing* A. Jaringan hari ke 1; B. Jaringan hari ke 3; C. Jaringan hari ke 5; D. Jaringan hari ke 8; E. Jaringan hari ke 10

4.2 Gambaran histologi jaringan ekor cecak

Gambaran histologi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*) pada fase *wound healing* menunjukkan tinginya aktivitas sel (Gambar 4.2). 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; dan hari ke 10.



Gambar 4.2 Gambaran histologi jaringan ekor cecak pada fase *wound healing*; A. histologi hari ke 1; B. histologi Hari ke 3; C. histologi hari ke 5; D. histologi hari ke 8; E. histologi hari ke 10

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. Sediaan histologis jaringan ekor cecak satu hari setelah autotomi belum menunjukkan adanya proses atau perubahan morfologis jaringan ekor, 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.

Pada proses regenerasi jaringan ekor cecak hari ke 3 setelah proses autotomi terdapat 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.

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

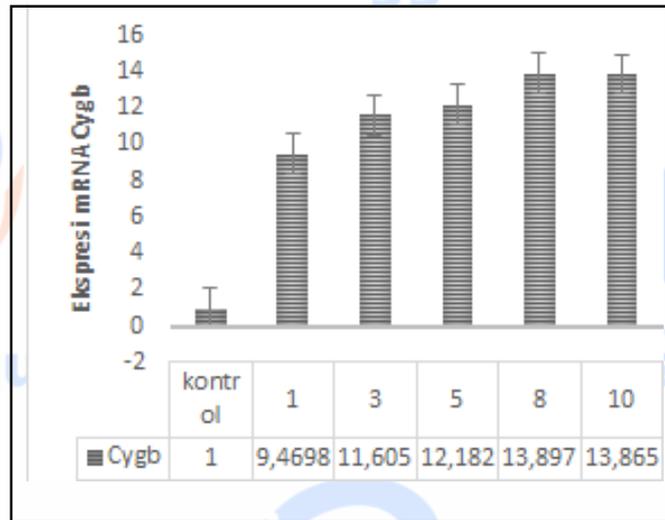
Pada sediaan histologis regenerasi jaringan ekor cecak pada hari ke 8 setelah autotomi terjadi pembentukan tulang belakang yang semakin terlihat memanjang, lapisan epidermis semakin tebal serta sel leukosit dan sel mirip fibroblas semakin banyak menyebar ke seluruh jaringan.

Pada hari ke 10 setelah autotomi 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.

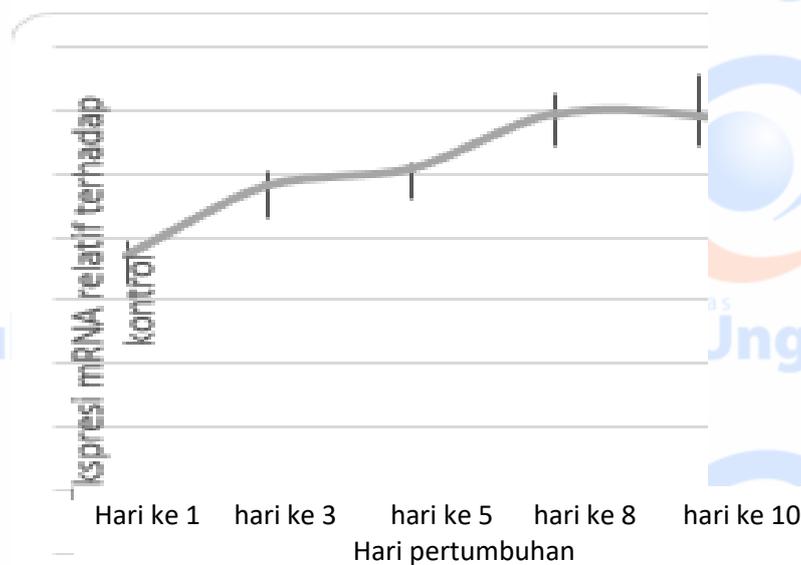
4.3 Ekspresi gen Cygb

Analisis ekspresi mRNA Cygb ditampilkan pada Gambar 4.3, tampak 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-10 proses

regenerasi jaringan dibandingkan kontrol. Ekspresi mRNA Cygb mencapai puncaknya pada hari-8 dan hari ke-10 (Gmbar 4.4), 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 4.3. Ekspresi relatif mRNA Cygb terhadap kontrol (K) mulai dari hari ke-1 sampai hari-10. $n = 15$, sebaran data normal ($p > 0,05$), namun hasil uji ANOVA tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara setiap hari pengamatan



Gambar 4.4 Grafik pertumbuhan jaringan dari hari ke 1 sampai hari ke 10

BAB 5. DISKUSI

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.(34) Penelitian lain mengenai regenerasi jaringan yang menganalisis aspek hipoksia dilakukan pada organ hati tikus yang struktur organnya berbeda dengan ekor.(19) 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. (35)(2)

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.(3) Kelompok genus *Hemidactylus* memiliki kemampuan regenerasi ekor yang sangat tinggi. 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, sama halnya seperti jaringan pada organ gerak mamalia.(36)(37) Oleh karena itu ekor cecak rumah sangat tepat dijadikan model sederhana dalam mempelajari proses regenerasi jaringan bahkan organ pada penelitian kami.

Pertumbuhan panjang ekor cecak memperlihatkan pertumbuhan yang lambat pada fase *wpund* healing. Pada 10 hari pertama setelah autotomy merupakan tahap penyembuhan luka. Pada regenerasi organ kulit manusia, fase penyembuhan luka berlangsung relatif lama dan lambat.(14)

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.(12) 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.(2) 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.(19)

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.(38)

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 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.(20) 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.(3) Tingginya sel leukosit pada jaringan ekor cecak dihubungkan dengan perannya untuk memfagositosis bakteri, sel dan jaringan yang rusak.

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).(11) Pada amputasi ekor amfibi, terjadi proliferasi sel yang dimulai dari sel fibroblas pada jaringan ikat yang membentuk jaringan pembuluh darah.(38) 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. Pada saat yang bersamaan terjadi pembentukan sel endotel serta penambahan ketebalan jaringan dermis.

Proliferasi sel juga ditemukan pada ganglion saraf dan sel saraf tepi. Peningkatan sel saraf 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.(39) 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.(33) 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.(40) 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.(41) 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 endodermis.(38) Menurut Mescher, NGF

memiliki peran menstimulasi proliferasi sel, migrasi, diferensiasi, dan kelangsungan hidup sel saraf.(12)

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.(19) 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, , 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 perannya 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.(22) 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.(24) 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 proses metabolisme sel yang tinggi dan memerlukan oksigen yang tinggi pula.

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.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.

BAB 6.

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Pada fase *wound healing* terjadi aktivitas sel yang sangat tinggi yang memerlukan oksigen yang tinggi
2. Protein Cygb terekspresikan selama proses regenerasi jaringan, berkaitan dengan perannya dalam suplai oksigen ke dalam jaringan

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisis peranan sel saraf dan jaringan tulang dalam proses regenerasi jaringan dalam keadaan hipoksia
2. Analisis lebih lanjut peranan jaringan lemak yang kaya akan sel embrional dalam proses regenerasi jaringan.

REFERENSI

1. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1):45–53.
2. Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(1):36–45.
3. Alibardi L. *Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb regeneration in Lizards*. New York: Springer; 2010.
4. de Sanctis D, Dewilde S, Pesce A, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T BT. Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme d6a coordination. *J Mol Biol*. 2004;336(4):917–27.
5. Herman PE, Papatheodorou A, Bryant SA, Waterbury CKM, Herdy JR, Arcese AA, et al. Highly conserved molecular pathways, including Wnt signaling, promote functional recovery from spinal cord injury in lampreys. *Sci Rep [Internet]*. 2018;8(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-18757-1>
6. Liu X, Tong J, Zweier JR, Follmer D, Hemann C, Ismail RS, et al. Differences in oxygen-dependent nitric oxide metabolism by cytoglobin and myoglobin account for their differing functional roles. *FEBS J*. 2013;280(15):3621–31.
7. Beckerson P, Svistunenko D, Reeder B. Effect of the distal histidine on the peroxidatic activity of monomeric cytoglobin. *F1000Research*. 2015;4(May):87.
8. Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, Daskoulidou N, Bryan J, Gosney JR, et al. Cytoglobin has bimodal: Tumour suppressor and oncogene functions in lung cancer cell lines. *Hum Mol Genet*. 2013;22(16):3207–17.
9. 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 [Internet]*. 2014;111(1):E129–38. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1314962111>
10. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev*. 2006;20(13):1692–708.
11. Krafts KP. The hidden drama Tissue repair. *Organogenesis*. 2010;6(4):225–33.
12. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. 2017;(March):39–53.
13. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med [Internet]*. 2008;3(1):1–5. Available from:

- <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/17460751.3.1.1>
14. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35–43.
 15. 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.
 16. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3810–20.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E. to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. 2010;
 20. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation. *J Immunol* [Internet]. 2005;175(10):6257–63. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.175.10.6257>
 21. Sha S. Functional Characterization of cytoglobin. University of Hong Kong; 2011.
 22. Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, et al. Cytoglobin Is a Respiratory Protein in Connective Tissue and Neurons, Which Is Up-regulated by Hypoxia. *J Biol Chem.* 2004;279(9):8063–9.
 23. 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.
 24. Jusman SWA, Iswanti FC, Suyatna FD, Ferdinal F, Wanandi SI, Sadikin M. Cytoglobin expression in oxidative stressed liver during systemic chronic normobaric hypoxia and relation with HIF-1 α . *Med J Indones.* 2014;23(3):133–8.
 25. Halligan KE, Jourd FL, Jourd D. Cytoglobin Is Expressed in the Vasculature and Regulates Cell Respiration and Proliferation via Nitric Oxide Dioxygenation *. 2009;284(13):8539–47.
 26. 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.
 27. Lechauve C, Chauvierre C, Dewilde S, Moens L, Green BN, Marden MC, et al. Cytoglobin conformations and disulfide bond formation. *FEBS J.* 2010;277(12):2696–

- 704.
28. Vitulo N, Dalla Valle L, Skobo T, Valle G, Alibardi L. Transcriptome analysis of the regenerating tail vs. the scarring limb in lizard reveals pathways leading to successful vs. unsuccessful organ regeneration in amniotes. *Dev Dyn*. 2017;246(2):116–34.
 29. 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).
 30. 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.
 31. Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail regeneration: Regulation of two distinct cartilage regions by Indian hedgehog. *Dev Biol [Internet]*. 2015;399(2):249–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.12.036>
 32. 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 [Internet]*. 2015;6:1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10033>
 33. Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail skeletal regeneration combines aspects of fracture healing and blastema-based regeneration. *Development [Internet]*. 2016;143(16):2946–57. Available from: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.129585>
 34. 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 [Internet]*. 2012;295(10):1609–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.22537>
 35. Osuma EA, Riggs DW, Gibb AA, Hill BG. High throughput measurement of metabolism in planarians reveals activation of glycolysis during regeneration. *Regeneration [Internet]*. 2018;(August):1–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/reg2.95>
 36. Tkaczenko GK, Weterings R, Weterings R. Prey preference of the common house geckos *Hemidactylus frenatus* and *Hemidactylus Platyurus*. *Herpetol Notes*. 2014;7(August):483–8.
 37. Weterings R. Observations of an opportunistic feeding strategy in flat-tailed house geckos (*Hemidactylus platyurus*) living in buildings. *Herpetol Notes*. 2017;10(March):133–5.

38. Joven A, Simon A. Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2018;(March):0–1. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.04.006>
39. 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.
40. van de Ven C, Bialecka M, Neijts R, Young T, Rowland JE, Stringer EJ, et al. Concerted involvement of Cdx/Hox genes and Wnt signaling in morphogenesis of the caudal neural tube and cloacal derivatives from the posterior growth zone. *Development* [Internet]. 2011;138(17):3859–3859. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.072462>
41. 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).



LAMPIRAN

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
1	0,04	0,18	0,22	0,3	0,5
2	0,05	0,14	0,28	0,5	0,5
3	0,06	0,13	0,25	0,4	0,5
\bar{x}	0,05	0,15	0,25	0,4	0,5
SD	0,01	0,03	0,03	0,10	0,00
SEM	0,01	0,01	0,02	0,05	0,00

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

Pengulangan	Ekspresi semi kuantitatif mRNA <i>Cygb</i> relatif terhadap kontrol (rumus livak)				
	1	3	5	8	10
1	11,02	10,23	14,04	16,84	13,56
2	9,23	11,57	12,12	13,22	17,12
3	8,18	13,02	10,39	11,43	10,91
\bar{x}	9,4766667	11,6066667	12,1833333	13,83	13,8633333
SD	1,44	1,40	1,83	2,76	3,12
SEM	0,64	0,62	0,82	1,23	1,39

Lampiran 3. Biodata peneliti

Biodata Peneliti

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.
2	Jenis Kelamin	♂/P
3	Jabatan Fungsional	Asisten Ahli
4	NIP/NIK/No. identitas lainnya	3674065811680008
5	NIDN	0318116801
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Bandung, 18 November 1968
7	E-mail	titta@esaunggul.ac.id
8	Nomor Telepon/HP	021-749727/08568942269
9	Alamat Kantor	Jl Raya Arjuna no. 9 Kebun Jeruk Jakarta Barat
10	Nomor Telepon/Faks	021-5674223
11	Lulusan yg telah dihasilkan	S-1= 20 orang; S-2= 0 orang; S-3= 0 orang
12	Mata Kuliah yg diampu	1. Biologi
		2. Ilmu Dasar Keperawatan
		3. Biologi Molekuler

B. Riwayat Pendidikan

Program:	S-1	S-2	S-3
Nama PT	Universitas Indonesia	Universitas Indonesia	Universitas Indonesia
Bidang Ilmu	Biologi	Biomedik	Biomedik
Tahun Masuk-Lulus	1988-1994	2004-2006	2013-.2018
Judul Skripsi/Tesis/Disertasi	Pengaruh cadmium terhadap aberasi kromosom pada	Analisis mikrodelesi AZFc pada pria	Analisis Ekspresi gen HIF 1a, HIF 2a, Cygb, ROS dan

	mencit <i>Mus musculus</i>	infertile	PGC1 dan peranannya dalam proses regenerasi jaringan
Nama Pembimbingan/Promotor	Dr. Dewi	Dr. Dwi Anita Suryandari	Prof. Dr. Mohamad Sadikin, D.Sc.

C. Pengalaman Penelitian dalam 5 Tahun Terakhir
(Bukan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi)

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2012	Analisis komparasi kadar Timbal pada pasien kanker payudara dan wanita normal	internal UEU	3,0
2	2013	Analisis jumlah sel darah hemolisis pada penduduk perkotaan	Internal UEU	3,0
3	20	Analisis ferning test pada sel apusan pipi pada fase ovulasi pada wanita pekerja urban	Internal UEU	3,0
	2015	Analisis komparasi kerusakan rambut pada wanita pengguna kendaraan bermotor dengan wanita bukan pengguna kendaraan bermotor	Internal UEU	3,0
5	2016	Analisis Metoda Pendidikan pencegahan penyakit ISPA pada masyarakat di Kepulauan Seribu	Hibah Dikti	57,5
6	2016	Analisis Genomik dan proteomic ekspresi gen HIF 1a, HIF a dan Cygb pada regenerasi jaringan ekor cecak	Hibah Riset UI	68,0
7	2017	Kajian Bioinformatika Gen unidentified HIF 1 a cecak yang berperan dalam proses regenerasi jaringan	mandiri	5,0

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
8.	2018	Analisis secara imunohistokimia dan qRT PCR pada gen penyandi hipoksia, pembawa oksigen, dan biogenesis mitokondria pada proses regenerasi jaringan ekor cecak	Hibah Tadok UI	60

**Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema penelitian DIKTI maupun dari sumber lainnya*

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian Kepada Masyarakat	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (Juta Rp)
1	2011	Penyuluhan Kesehatan Reproduksi Pada Wanita Usia Remaja Wilayah Kecamatan Pamulang Tangerang Selatan Banten	eksternal	0,3
2	2012	Pemeriksaan kadar gula darah dan asam urat pada penduduk Kecamatan Pamulang Tangerang Selatan Banten	eksternal	0,3
3	2013	Pemeriksaan kadar gula darah dan asam urat pada penduduk Kecamatan Pamulang Tangerang Selatan Banten	eksternal	0,3
4	2014	Pemberian juz untuk pasien diabetes	eksternal	0,5
5	016	Penyuluhan pencegahan penyakit Genetika pada masyarakat Duri Kepa	mandiri	3,0

**Tuliskan sumber pendanaan baik dari skema pengabdian kepada masyarakat DIKTI maupun dari sumber lainnya*

E. Publikasi Artikel Ilmiah Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	01			
1	2016	Analisis korelasi aktivitas masyarakat perkotaan pengguna Kendaraan bermotor dengan jumlah sel darah	Indonesian Journal of Nursing Health	vol. 1/1/2016

No.	Tahun	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/ Nomor/Tahun
1	01			
2	2015	merah yang mengalami hemolysis Upaya komunikasi, informasi dan edukasi (KIE) dalam peningkatan pengetahuan mengenai perilaku hidup bersih dan sehat (PHBS) tatanan rumah tangga pada nelayan di muara angke, Jakarta	Science Jurnal Pengabdian Masyarakat	vol 2/no 1/2015
3	016			
Dst				

F. Pemakalah Seminar Ilmiah (*Oral Presentation*) dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Jurnal Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1	Seminar Nasional Biologi		UIN Alauddin Makasar, Agustus 2016
2	Seminar Nasional Lahan Basah		Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin, November 2016
3	Seminar International Hipoksia		Universitas Indonesia, November 2016

G. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1				
2				
3				
Dst				

H. Perolehan HKI dalam 5-10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1	Kajian Bioinformatika unidentified gen HIF 1 a cetak dalam Proses Regenerasi Jaringan			
2				
3				
Dst				

I. Pengalaman Merumuskan Kebijakan Publik/Rekayasa Sosial Lainnya dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema/Jenis Rekayasa Sosial Lainnya yang Telah Diterapkan	Tahun	Tempat Penerapan	Respon Masyarakat
1	Perumusan Naskah Akademik kurikulum Program Studi Bioteknologi se Indonesia	2017	Universitas Pelita Harapan dan Universitas Brawijaya	Baik

J. Penghargaan dalam 10 Tahun Terakhir (dari pemerintah, asosiasi atau institusi lainnya)

No.	Jenis Penghargaan	Institusi Pemberi Penghargaan	Tahun
1			
2			
3			
Dst			

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggungjawabkan secara hukum. Apabila di kemudian hari ternyata dijumpai ketidaksesuaian dengan kenyataan, saya sanggup menerima sanksi.

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam pengajuan hibah internal

Jakarta, 8 November 2018
Ketua/Anggota Pengusul,

(Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.)



Lampiran 4

SURAT PERNYATAAN PENELITI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.
NIDN : 0318116801
Jabatan/golongan : staf pengajar/
Jabatan Funngsional : Asisten Ahli

Dengan ini menyatakan bahwa proposal penelitian saya dengan judul :

**EKSPRESI GEN SITOGLOBIN PADA FASE *WOUND HEALING*
PROSES REGENERASI JARINGAN**

Yang diusulkan dalam skema hibah internal **dari oleh lembaga/sumber dana lain.**

Bilamana di kemudian hari ditemukan ketidaksesuain dengan pernyataan ini, maka saya bersedia dituntut dan diproses dengan ketentuan yang berlaku dan mengembalikan seluruh biaya penelitian yang sudah diterima ke kas Negara.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dengan sebenar-benarnya.

Jakarta, 8 November 2018

Yang menyatakan,

Mengetahui

Ketua Lembaga Penelitian/Warek 1



(Roesfiansjah Rasjidin, MT. PhD.)
NIK. 201050167

(Dr. Titta Novianti, S.Si., M.Biomed.)
NIK 215050590

