

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

LAPORAN

PENELITIAN INTERNAL

IDENTIFIKASI UNIDENTIFIED GEN SITOGLOBIN (Cygb)

DENGAN DESAIN PRIMER MULTIPLE ALIGNMENT DAN qPCR mRNA PADA
PROSES REGENERASI JARINGAN EKOR CECAK (*Hemidactylus Platyurus*)

PENGUSUL

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

NIDN 0318116801

UNIVERSITAS ESA UNGGUL

OKTOBER 2017

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN INTERNAL**

Judul Penelitian

: Identifikasi Unidentified gen Sitoglobin (Cygb) dengan Desain Primer Multiple Alignment dan qPCR mRNA pada proses regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*)

Kode>Nama Rumpun Ilmu Peneliti : 307/Kedokteran Dasar (Biomedis)

- a. Nama Lengkap : 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 : 6

Anggota peneliti


Biaya yang diusulkan

: Rp. 15.000.000 (lima belas juta rupiah)

Jakarta, 25 Oktober 2017


Mengetahui,
Dekan/Ketua

Ketua Peneliti


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


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

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian,


(DR. Hasyim, SE., MM. M.Ed.)
NIK. 215090603

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Identifikasi Unidentified gen Sitogloblin (Cygb) dengan Desain Primer Multiple Alignment dan qPCR mRNA pada proses regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*)

2. Peneliti : Universitas

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: September tahun: 2017

Berakhir : bulan: Oktober tahun: 2018

5. Usulan Biaya : Rp . 15.000.000,-

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan) : Laboratorium Biokimia FKUI, laboratorium Zoologi LIPI

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

LIPI Zoologi : Tempat pemeliharaan dan perlakuan hewan cecak

Laboratorium Biokimia FKUI : menganalisis qPCR mRNA gen

8. Temuan yang ditargetkan :

Target temuan adalah identifikasi gen Cygb cecak yang belum teridentifikasi sebelumnya, melalui metoda multiple alignment dan diamplikasi dengan etoda qPCR untuk pembuktian adanya gen tersebut pada jaringan ekor cecak yang diduga berperan dalam proses regenerasi jaringan.

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu

Identifikasi gen Cygb pada proses regenerasi jaringan ekor cecak merupakan temuan penting yang akan menjadi dasar dalam penelitian selanjutnya untuk indentifikasi gen yang berperan dalam proses regenerasi jaringan, sehingga proses identifikasi ini dapat menjad acuan dalam hal terapi bagi pasien yang mengalami luka pada jaringan.

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 : 2017

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

1. International Conference Biology and Biotechnology in Korea tahun 2018
2. Seminar Nasional Biodiversitas dan Bioteknologi di Surabaya tahun 2018

12. Rencana luaran :

1. HKI : desain primer gen *Cygb* cecak (*Hemidactylus Platyurus*) 2018
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		15
3.1 Bagan penelitian		12
BAB 4 BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN		18
4.1 Anggaran Biaya		18
4.2 Jadwal Penelitian		18
REFERENSI		19
Lampiran		22
Lampiran 1. Justifikasi Anggaran Penelitian		22
Lampiran 2 Dukungan Sarana dan Prasarana		25
Lampiran 3 Biodata Peneliti		26
Lampiran 4 Surat Pernyataan Peneliti		29

RINGKASAN

Saat terjadi kerusakan pada jaringan, regenerasi jaringan pada setiap organisme sangat diperlukan untuk pemulihan struktur pasca luka dan fungsi jaringan. Cecak (*Hemidactylus Platyurus*) termasuk kelas reptilia, memiliki kemampuan regenerasi jaringan ekor yang cukup tinggi untuk mempertahankan diri. Kejadian luka dapat menyebabkan kejadian hipoksia pada jaringan, sehingga mestimulasi ekspresi gen sitoglobin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara fungsional peranan sitoglobin dalam regenerasi jaringan diduga menghambat stress oksidasi pada sel satelit yang berperan dalam regenerasi sel jaringan. Sitoglobin terbukti memiliki daya afinitas tinggi terhadap besi untuk ikatan luar dan memiliki oksigen yang seimbang seperti halnya myoglobin. Oleh karena itu, diduga sitoglobin terlibat dalam difusi oksigen menuju mitokondria. Penelitian gen *Cygb* pada regenerasi jaringan ini menggunakan ekor cecak, namun gen *Cygb* pada cecak belum teridentifikasi. Proses identifikasi gen dapat dilakukan dengan metoda *multiple alignment* dari kekerabatan terdekatnya dengan mencari kesamaan terhadap sekuen lainnya di pusat data GeneBank. Perangkat lunak on-line yang paling banyak digunakan adalah BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tools) dari web site blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Software Mega mampu mencari daerah basa yang konservasinya tinggi dengan metoda Clustal, untuk memperoleh desain primer gen *Cygb* menggunakan software primer 3. Hasil penelusuran dengan metoda *multiple alignment* diperoleh desain primer R: CTCCTCTGTACTGGCCTTGG dan F: TCCTTGTACGCAGCAGTCAC. Hasil identifikasi gen dengan metoda qPCR menunjukkan adanya amplifikasi dan ekspresi gen tersebut, yang menunjukkan keberhasilan proses identifikasi gen tersebut. Pada penelitian ini digunakan 28 ekor cecak sebagai model dan dilakukan autotomy pada ekor, dan dieutanasia 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 dan hari ke 30. Hasil perhitungan ekspresi gen qPCR secara statistika dengan metoda anova, diperoleh nilai $d = 0,000$ yang menunjukkan adanya perbedaan ekspresi pada setiap hari pertumbuhan jaringan ekor.

Kata Kunci : Desain primer, mega 7, reptilia, BLAST



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. 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 gen. Beberapa hewan reptil dan amfibi hanya dapat meregenerasi bagian ekor yang hilang seperti kecebong dan cecak (Lukman, 2009)

Sitoglobin merupakan senyawa berbentuk homodimer yang diikat oleh ikatan Cys-disulfida, dengan unsur heme menghadap sisi berlawanan dengan ikatan dimer (de Santis et al., 2004). Sitoglobin terbukti memiliki daya afinitas terhadap besi untuk ikatan luar dan memiliki oksigen yang seimbang seperti halnya myoglobin. Oleh karena itu, diduga sitoglobin terlibat dalam difusi oksigen menuju mitokondria, hal ini yang menjadi pertanyaan Schmidt et al (2004).

Sitoglobin menyebar pada populasi sel, namun tidak berkaitan dengan tingginya konsumsi oksigen dan tingkat metabolisme. Hal ini menunjukkan bahwa sitoglobin tidak berperan pada proses difusi oksigen. Hasil yang kontradiksi telah dilaporkan, mengenai regulasi dan fungsi sitoglobin dalam keadaan hipoksia. Perubahan yang signifikan dalam ekspresi sitoglobin dalam jaringan kortikal otak setelah mengalami hipoksia berkelanjutan atau pada saat terapi hipoksia (Li et al 2006). Kadar mRNA sitoglobin meningkat saat hipoksia (Schmidt et al 2004). Secara kontras, hasil sebelumnya telah melaporkan bahwa tingkat mRNA dan protein cytoglobin tidak berubah secara signifikan di otak, meskipun di bawah kondisi hipoksia berkelanjutan atau intermiten (Li et al, 2006;.. Li et al, 2007).

Terdapat penelitian yang berbeda tentang fungsi cytoglobin dalam keadaan hipoksia. Emara et al., (2010) menemukan bahwa cytoglobin yang diatur dalam cell line glioblastoma manusia yang beraneka ragam dan jaringan tumor manusia, mengimplikasikan bahwa cytoglobin mungkin sebagian berkontribusi pada repertoar mekanisme pertahanan dan memungkinkan sel-sel kanker untuk bertahan hidup dalam keadaan hipoksia. Sebuah analisis sebelumnya tentang ekspresi cytoglobin pada otak tikus dewasa dalam keadaan hipoksia kronis, paparan hipoksia menunjukkan terjadinya peningkatan cytoglobin pada tingkat

transkripsi di daerah otak sebagai respon terhadap stres oksidatif. Hal ini menunjukkan bahwa cytoglobin dapat berfungsi di sitoproteksi dan metabolik / homeostasis kardiovaskular (Mammen et al., 2006)

Metoda multiple alignment merupakan metoda pengembangan pelacak DNA gen spesifik yang belum teridentifikasi. Metoda ini sangat penting untuk menganalisis ketersediaan gen tersebut dalam suatu proses biologis. Pelacakan DNA spesifik gen *Cygb* sangat diperlukan untuk menganalisis keberadaan gen tersebut dalam proses regenerasi ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*). Pendekatan dengan teknik bioinformatika dengan metoda multiple alignment, serta metoda PCR untuk memastikan gen tersebut dapat diamplifikasi, merupakan salah satu cara yang relatif lebih mudah. (Santoso, 2001).

Sekuen DNA dapat dicari kesamaannya terhadap sekuen lainnya di pusat data GeneBank dari kekerabatan terdekatnya dengan menggunakan teknik alignment dan hasil kajian filogenetik. Perangkat lunak on-line yang paling banyak digunakan untuk metoda alignment adalah BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tools) dari web site blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. teknik BLAST mampu menghasilkan sekuen yang mirip dari kekerabatan terdekat sampai kekerabatan yang jauh sekalipun. Software Mega mampu mencari daerah basa yang terkonservasi dari dengan metoda Clustal. Identifikasi gen selanjutnya dengan metoda qPCR secara kuantitas atau elektroforesis secara kualitas.

1.2 Perumusan Masalah

Regenerasi jaringan merupakan proses rumit yang melibatkan berbagai sel, gen dan protein. Pada penelitian ini akan mengidentifikasi gen *Cygb* pada cecak (*Hemidactylus platyurus*) yang belum teridentifikasi sebelumnya, dengan metoda multiple alignment sertadiidentifikasi keberadaannya dalam proses regenerasi jaringan dengan metoda ampifikasi gen qPCR..

1.3 Kebaharuan yang ditemukan

Kebaharuan yang ditemukan dalam penelitian ini adalah identifikasi gen *Cygb* cecak (*Hemidactylus platyurus*) serta keberadaannya dalam proses regenerasi jaringan ekor cecak.

1.4 Tujuan Khusus

- a. Identifikasi gen *Cygb* cecak (*Hemidactylus platyurus*) dengan metoda multiple alignment
- b. Identifikasi gen *Cygb* dalam proses regenerasi jaringan ekor cecak dengan metoda amplifikasi qPCR gen *Cygb*.

1.5 Urgensi (keutamaan) penelitian

Urgensi penelitian ini adalah sebagai langkah awal untuk penelitian selanjutnya dalam proses identifikasi gen dan protein yang berperan dalam proses regenerasi jaringan sebagai dasar terapi pada jaringan luka atau autotomi organ sehingga terjadi regenerasi jaringan yang akan menumbuhkan jaringan baru seperti jaringan sebelumnya.

1.6 Target temuan dan kontribusinya terhadap ilmu pengetahuan

Target temuannya identifikasi gen *Cygb* cecak serta keberadaannya dalam proses regenerasi jaringan. Kontribusinya terhadap ilmu pengetahuan menambah temuan baru dalam proses identifikasi gen yang belum teridentifikasi sebelumnya dan berkontribusi menambah keilmuan gen yang berada dalam proses regenerasi jaringan.

Tabel 1. Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian
1	Publikasi ilmiah ¹⁾	Internasional Bereputasi	belum
		Nasional Terakreditasi	belum
2	Pemakalah dalam pertemuan ilmiah ²⁾	Internasional	belum
		Nasional	belum
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 fisiologis dan morfologi organisme (Fausto, *et. al.*, 2006).

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 (Fausto, *et. al.*, 2006).

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 sinyal sel (Malda, *et. al.*, 2007).

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 (Soesilo, 2009; Hutchin, 2014; Ken & Costa, 2006).

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 autotomy 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 (Soesilo, 2009; Hutchin, *et.al.*, 2014).

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 kolumna vertebrae pada ekor hasil regenerasi lebih sederhana sehingga berbeda dari ekor yang normal (Lukman, 2009).

2.2 Hipoksia dan gen Cytoglobin

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. Organisme aerob, dari prokariot sampai eukariot yang kompleks, mempunyai mekanisme homeostasis yang adaptif untuk mengatasi hipoksia baik pada tingkat sistemik maupun seluler. 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 (Prabhakar & Semenza, 2012).

Protein sitoglobin mengandung heme, merupakan anggota dari *family* globin yang memiliki struktur sama dengan *myoglobin*. Sitoglobin ditemukan pada beberapa hewan mamalia, ikan, amfibi, reptil dan burung. Peranan sitoglobin dalam regenerasi jaringan diduga menghambat stress oksidasi pada sel SCs yang berperan dalam regenerasi sel jaringan (Singh, *et.al.*; 2013; Jusman *et. al.*, 2014; Halligen, *et.al.*, 2009).

Filogenik sitoglobin dan myoglobin sangat dekat dan mungkin memiliki fungsi yang sama. Myoglobin berfungsi mendifusikan oksigen ke rantai respirasi di mitokondria dan menyimpan oksigen di otot. Meurut Sawai et al (2003), diperkirakan sitoglobin memiliki fungsi yang sama. Sitoglobin terbukti memiliki daya afinitas terhadap besi untuk ikatan luar

dan memiliki oksigen yang seimbang seperti halnya myoglobin. Oleh karena itu, diduga sitoglobin terlibat dalam difusi oksigen menuju mitokondria, hal ini yang menjadi pertanyaan Schmidt a al (2004). Sitoglobin menyebar pada populasi sel, namun tidak berkaitan dengan tingginya konsumsi oksigen dan tingkat metabolisme. Hal ini menunjukkan bahwa sitoglobin tidak berperan pada proses difusi oksigen.

2.3 Multiple alignment

Multiple alignment adalah untuk menentukan apakah satu sekuens DNA atau protein homolog dengan sekuens lainnya dengan cara mensejajarkan basa atau asam amino yang sama. Proses alignment yang melibatkan dua sekuens yang homolog disebut pairwise alignment, sedangkan yang melibatkan banyak sekuens yang homolog disebut multiple alignment. Keberhasilan analisis filogenetika sangat tergantung kepada akurasi proses alignment. Saat ini, banyak program komputer tersedia secara gratis di internet untuk membantu proses alignment, misalnya ClustalX.

Sekuens DNA dapat dicari kesamaannya terhadap sekuens lainnya di pusat data GeneBank dari kekerabatan terdekatnya dengan menggunakan teknik alignment dan hasil kajian filogenetik. Perangkat lunak on-line yang paling banyak digunakan untuk metoda alignment adalah BLAST (Basic Local Alignment Sequence Tools) dari web site blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Teknik BLAST mampu menghasilkan sekuens yang mirip dari kekerabatan terdekat sampai kekerabatan yang jauh sekalipun. Software Mega mampu mencari daerah basa yang terkonservasi dari dengan metoda Clustal. Identifikasi gen selanjutnya dengan metoda qPCR secara kuantitas atau elektroforesis secara kualitas.

Metode multiple alignment paling banyak digunakan di biologi molekuler untuk mensejajarkan sekuens basa nukleotida atau sekuens asam amino dengan sekuens dari organisma lainnya. Kelompok organisma yang kekerabatannya paling dekat dengan sekuens yang di sejajarkan diurutkan sebagai kelompok pertama dan kelompok ini secara bertahap saling mensejajarkan dan tetap mempertahankan hasil alignment yang pertama. Metoda ini baik digunakan untuk menganalisis kedekatan hubungan antar organisma. Beberapa sekuens yang telah ditemukan oleh peneliti akan secara otomatis muncul dan akan mensejajarkan dengan sekuens pertama sebanyak 3-7 sekuens.

2.4 Kuantitatif qPCR

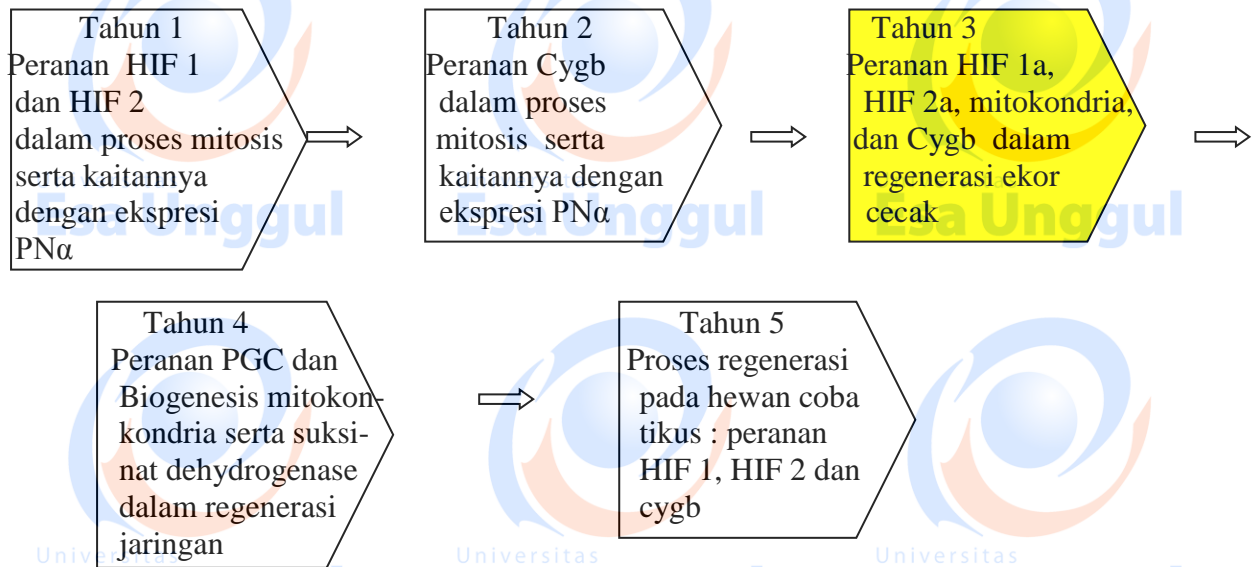
Analisa secara kuantitatif sekuen asam nukleat sangat penting dilakukan pada penelitian di bidang Biologi. Pengukuran ekspresi gen (RNA) digunakan untuk menganalisis respon biologi pada berbagai stimulasi gen. Berbagai metoda digunakan untuk menganalisis sekuen gen DNA dan RNA. Akhir-akhir ini, metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dipercaya sebagai metoda yang lebih baik dalam menganalisa basa nukleotida. Metoda PCR dan *reverse transcriptase* (RT)-PCR dapat menganalisis basa nukleotida secara kuantitatif. Beberapa hasil penelitian dengan metoda konvensional tidak berhasil menganalisis basa nukleotida secara kuantitatif. Namun metoda PCR dan RT-PCR hanya mampu menghitung hasil dari amplifikasi DNA atau RNA namun tidak menghitung kuantitas sekuen basa nukleotida target. Hal yang penting adalah mendesain gen control untuk mengukur secara kuantitas sekuen basa nukleotida target. Satu metoda yang paling tepat adalah mengukur produk PCR pada fase log sebelum grafik mendatar. Menggunakan metoda PCR konvensional, penghitungan basa nukleotida secara kuantitatif dapat dilakukan pada pita DNA hasil elektroforesis, sehingga para peneliti harus teliti menganalisa bahwa sampel yang dihitung terekspresikan selama log phase. Pada metoda qPCR digunakan penghitungan secara kuantitas dengan menggunakan gen competitor internal control pada setiap reaksi.

3.3 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 :

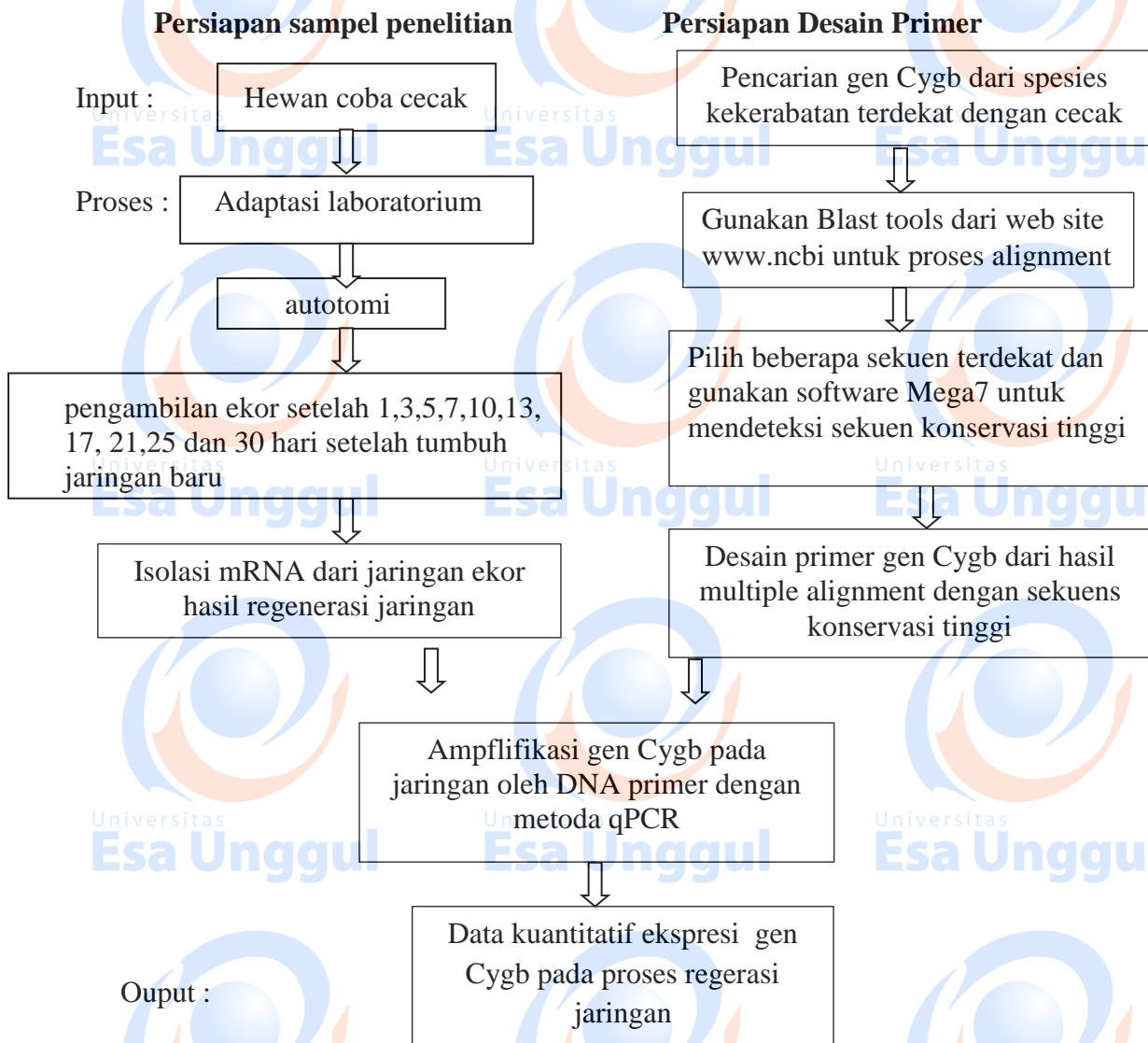


3.4 Kontribusi dan kebaruan yang akan dihasilkan

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



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*.

Metoda

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 soft ware 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.

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, disentrifugasi 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 ethanol 70 % dua kali dan simpan dalam E buffer sebanyak 35 ul, dilakukan pengukuran konsentrasi RNA dengan nanodrop varioscan serta

Pengujian Integritas RNA Total sebanyak 2µl 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 .

Ekspresi gen qPCR

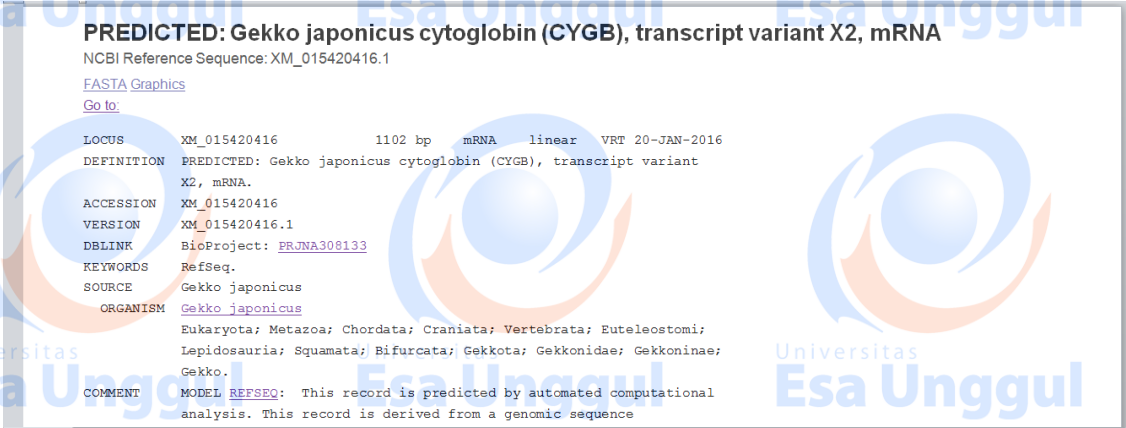
Dilakukan pengenceran hasil isolasi RNA dengan konsentrasi 10 ng/ul menggunakan TE buffer. Larutan mix Kit qPCR dari merk Kappa sebanyak 10 µl untuk setiap sampel dengan komposisi 2x Kappa sebanyak 5 µl, Forward DNA primer sebanyak 0,2 µl, Reverse DNA Primer sebanyak 0, 2 µl dan 5x kappa sebanyak 0,2 µl, sampel RNA sebanyak 2 µl dan DEPF FW sebanyak 2, 4 µl. Digunakan sampel control dan *house keeping gene* (18S) sebagai pembanding pada hasil kuanifikasi relative jumlah amplifikasi yang dihasilkan. Dilakukan ampilfikasi 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 ΔCT dihitung dengan cara pengurangan nilai CT 18S rRNA dengan nilai CT gen HIF 1 alpha. Nilai ΔCT antar kelompok dibandingkan secara deskriptif (Dietrich et al., 2011). Data hasil elektroforesis dianalisa secara deskriptif.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Desain Primer

Gen unidentified *Cygb Hemidactylus Platyurus* belum pernah diteliti dan belum diidentifikasi sebelumnya. Identifikasi gen tersebut sangat diperlukan untuk dapat menganalisis perannya dalam system biologi organisme. Analisis ekspresi gen tersebut melalui berbagai metoda, salah satunya adalah metoda qPCR dapat melihat keterkaitan gen tersebut dalam proses biologis organisma.

Salah satu metoda yang dapat digunakan dalam proses indentifikasi gen adalah dengan mencari kekerabatan terdekat dari organisma yang akan dianalisis. *Hemidactylus Platyurus* memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Gekko Japonicus* yang telah teridentifikasi gennya. Diperoleh hasil sebagai berikut :



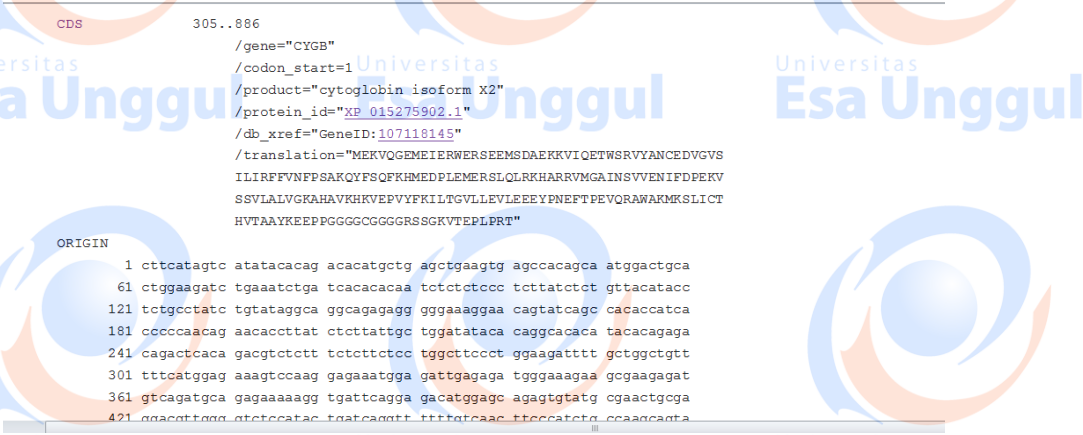
PREDICTED: Gekko japonicus cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA
NCBI Reference Sequence: XM_015420416.1

[FASTA Graphics](#)
[Go to:](#)

LOCUS	XM_015420416	1102 bp	mRNA	linear	VRT 20-JAN-2016
DEFINITION	PREDICTED: Gekko japonicus cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA.				
ACCESSION	XM_015420416				
VERSION	XM_015420416.1				
DBLINK	BioProject: PRJNA308133				
KEYWORDS	RefSeq.				
SOURCE	Gekko japonicus				
ORGANISM	Gekko japonicus Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Lepidosauria; Squamata; Bifurcata; Gekkota; Gekkonidae; Gekkoninae; Gekko.				
COMMENT	MODEL REFSEQ : This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence				

Gambar 1. Gen predicted cygb *Gekko Japonicus*

Dengan cds (coding domain sequence) ;



```
CDS             305..886
                /gene="CYGB"
                /codon_start=1
                /product="cytoglobin isoform X2"
                /protein_id="XP_015275902.1"
                /db_xref="GeneID:107118145"
                /translation="MEKVGEMEI ERWERSEEMSDAEKKVIQETWSRVYANCEDVGV
                ILIRPFVNFPSAKQYFSPFKHMDPEMERLQLRKHARRVMGAINSVVENIFDPEKV
                SSVLALVGRAHAVKHKEPVYFKILTGVLLEVLLEEEYPNEPTPEVQRAWAKMKSLLCT
                HVTAAKKEPPGGGGCGGGRRSGKVTEPLPRT"
ORIGIN
1   ctccatagtc atatacacag acacatgctg agctgaagtg agccacagca atggactgca
61   ctggaagatc tgaaatctga tcacacacaa tctctctccc tcttatctct gttacatacc
121  tctgctctatc tgtataggca ggcagagagg gggaaaggaa cagtatcage cacaccatca
181  ccccacaacag aacaccttat ctcttattgc tggatataca caggcaaca tacacagaga
241  cagactcaea gactctctt tctctctccc tggcttccct ggaagatitt gctgctgtt
301  ttccatggag aaagtccaag gagaatgga gattgagaga tgggaaagaa gogaagagat
361  gtcagatgca gagaaaaagg tgattcagga gacatggag agagtgtatg cgaactgca
421  gaacattaga atctccatac taatcaatt tttttcaac ttccatcta ccaagcata
```

Gambar 2. Daerah Cds gen Cygb *Gekko Japonicus*

Dari hasil BLAST gen cytoglobin *Gecko Japonicus* diperoleh hasil sebagai berikut :

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: <i>Gecko japonicus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA	2036	2036	100%	0.0	100%	XM_015420416.1
PREDICTED: <i>Gecko japonicus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	1495	2039	100%	0.0	100%	XM_015420415.1
PREDICTED: <i>Python bivittatus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	1127	1127	100%	0.0	85%	XM_007430336.2
<i>Iguana iguana</i> cytoglobin-2 (cygb-2) mRNA, complete cds	1077	1077	74%	0.0	90%	EF061939.1
PREDICTED: <i>Anolis carolinensis</i> cytoglobin (cygb), transcript variant X2, mRNA	1027	1027	80%	0.0	88%	XM_016991325.1
PREDICTED: <i>Pogona vitticeps</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA	992	992	74%	0.0	89%	XM_020806489.1
PREDICTED: <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	992	992	80%	0.0	87%	XM_015818896.1
PREDICTED: <i>Thamnophis sirtalis</i> cytoglobin (CYGB), mRNA	953	953	78%	0.0	87%	XM_014071881.1
PREDICTED: <i>Python bivittatus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA	824	824	73%	0.0	85%	XM_007430337.2
PREDICTED: <i>Pogona vitticeps</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	710	995	74%	0.0	91%	XM_020806489.1
PREDICTED: <i>Protobothrops mucrosquamatus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA	710	710	53%	0.0	88%	XM_015818897.1
<i>Iguana iguana</i> cytoglobin-1 (cygb-1) mRNA, complete cds	704	1080	74%	0.0	91%	EF061938.1
PREDICTED: <i>Anolis carolinensis</i> cytoglobin (cygb), transcript variant X1, mRNA	676	1030	80%	0.0	87%	XM_008104367.2
PREDICTED: <i>Alligator mississippiensis</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X2, mRNA	636	636	54%	5e-178	86%	XM_014601911.2
PREDICTED: <i>Alligator sinensis</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	636	636	54%	5e-178	86%	XM_006018311.2
PREDICTED: <i>Crocodylus porosus</i> cytoglobin (CYGB), transcript variant X1, mRNA	630	630	54%	2e-176	86%	XM_019542659.1

Gambar 3. Hasil BLAST gen *Cygb Hemidactylus Platyurus* dengan berbagai spesies yang dekat kekerabatannya

Hasil dari proses BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) adalah kumpulan beberapa spesies yang dekat kekerabatannya. Kumpulan spesies hasil BLAST ini di alignment dengan metoda multiple alignment dengan tools clustal dalam software MEGA7. Hasil dari multiple alignment adalah sebagai berikut :

Species/Abbrv	Group Name	Sequence
1. XM_015420416.1 PREDICTED: <i>Gecko japonicus</i>		A A C A C A T G G A G A G T C C G C T A G A G A T G G A G A G G A G T T T G C A G C T G C G T A A A C T G C C A G A C G G G T C A T G G G G C C A T T T
2. XM_015420415.1 PREDICTED: <i>Gecko japonicus</i>		A A C A C A T G G A G A G T C C G C T A G A G A T G G A G A G G A G T T T G C A G C T G C G T A A A C T G C C A G A C G G G T C A T G G G G C C A T T T
3. XM_016991325.1 PREDICTED: <i>Anolis carolinensis</i>		A C C A C A T G G A G A G C C C C C T A G A G A T G G A G A G A G A C T G C A G C T G C G T A A A C C C C A G C G G G T C A T G G G G C C A T T T
4. XM_008104367.2 PREDICTED: <i>Anolis carolinensis</i>		A C C A C A T G G A G A G C C C C C T A G A G A T G G A G A G A G A C T G C A G C T G C G T A A A C C C C A G C G G G T C A T G G G G C C A T T T
5. EF061939.1 <i>Iguana iguana</i> cytoglobin-2 (cygb)		A C C A C A T G G A G A G C C C C C T A G A G A T G G A G A G G A G C T G C A G C T G C G T A A A C C C C A G C G G G T C A T G G G G C C A T T T
6. XM_007430336.2 PREDICTED: <i>Python bivittatus</i>		A C C A C A T G G A G A G T C C A C T A G A G A T G G A G A G G A G T C T G C A G C T G C G T A A A C T G C C A G A C G G G T C A T G G G G C C A T T T
7. EF061938.1 <i>Iguana iguana</i> cytoglobin-1 (cygb)		A C C A C A T G G A G A G C C C C C T A G A G A T G G A G A G A G A C C C C A G C T G C G T A A A C C C C A G C G G G T C A T G G G G C C A T T T
8. XM_015818896.1 PREDICTED: <i>Protobothrops mucrosquamatus</i>		A C C A C A T G G A G A G T C C A T T A G A G A T G G A G A G A G C C C T G C A G C T G C G G A A A C A T G C C A G A G A G G G T C A T G G G G C C A T T T
9. XM_014071881.1 PREDICTED: <i>Thamnophis sirtalis</i>		A C C A C A T G G A G A G T C C A T T A G A G A T G G A G A G A G A C C C T G C A G C T G C G T A A A C A T G C C A G A G A G G G T C A T G G G G C C A T T T
10. XM_014601911.2 PREDICTED: <i>Alligator mississippiensis</i>		A C C A C A T G G A G A G C C C A C T T G A G A T G G A G A G A G A C C C T G C A G C T G C G C A C A T G C C C G G C G G G T C A T G G G T G C C A T T C

Gambar 4. Multiple alignment dengan metoda clustal software MEGA 7

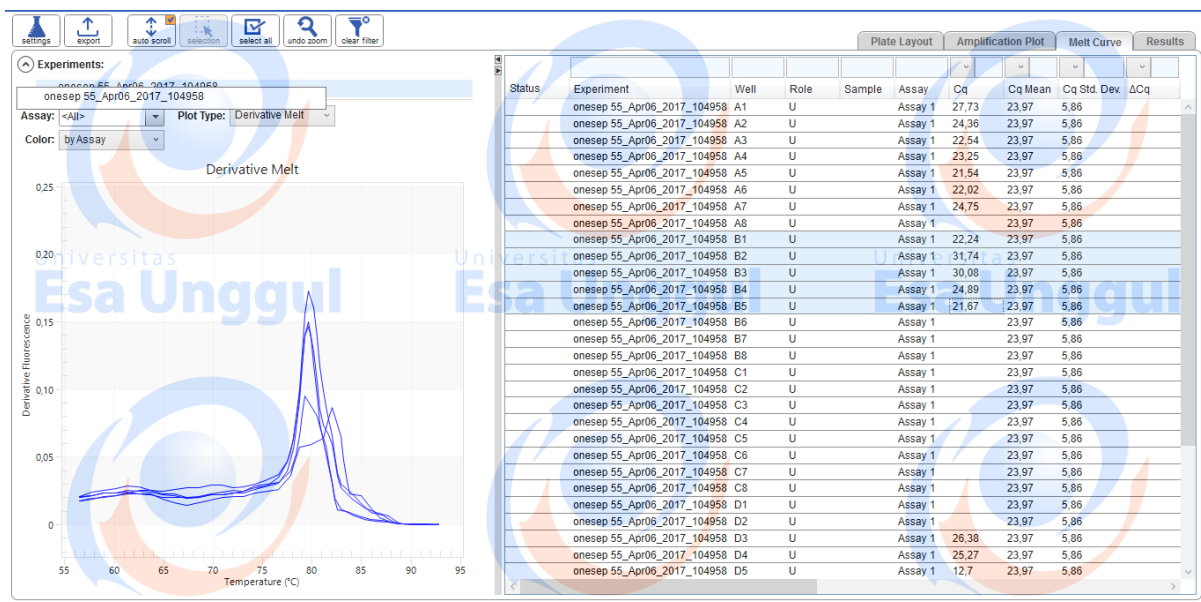
Diperoleh beberapa sekuens yang memiliki sekuens dengan konservasi tinggi, sehingga dan dipilih daerah cds (coding domain sequence). Hasil analisis dengan primer 3 diperoleh desain DNA primer pada daerah cds dengan konseravsi tinggi pada hasil multiple alignment clustal MEGA 7.

	Start	len	tm	%GC	sekuen
left primer	610	20	59.86	60.00	4.00 2.00 CTCCTCTGTACTGGCCTTGG
right primer	807	20	60.06	55.00	4.00 3.00 TCCTTGTACGCAGCAGTCAC

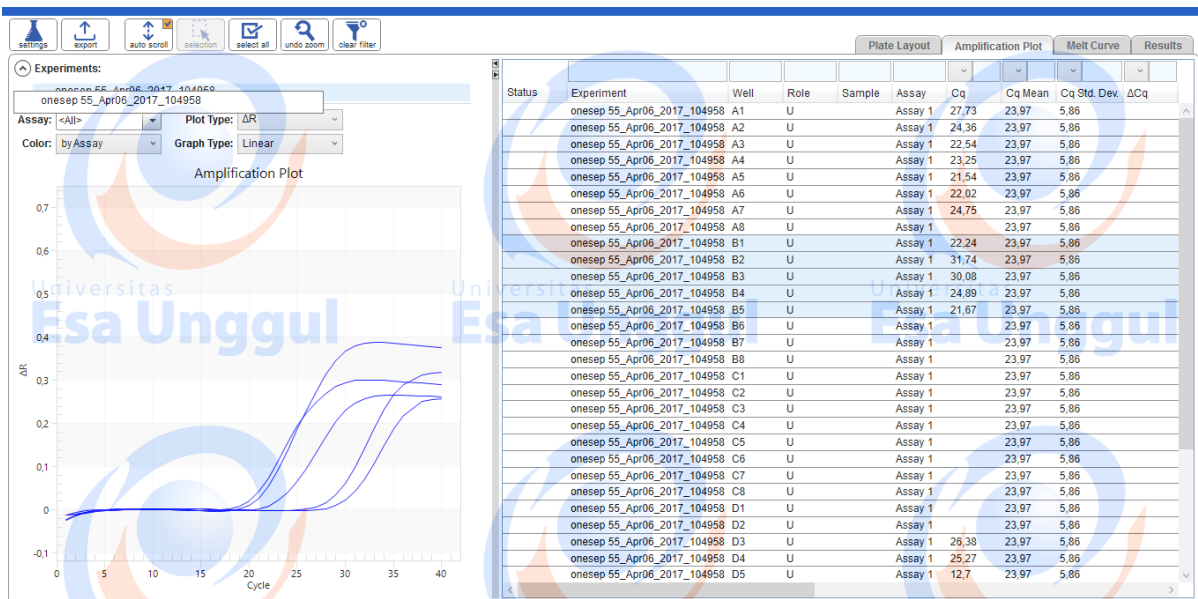
Diperoleh desain DNA primer dengan forward berawal dari basa ke 610 dan forward dari basa ke 807, daerah ini merupakan daerah cds dari basa ke 305-886. Panjang basa DNA primer 20, dengan suhu melting antara sekuen forward dan reverse yang tidak berbeda jauh ($59,86^{\circ}\text{C} - 60,06^{\circ}\text{C}$), dengan presentase 55-60 %, hal tersebut sesuai dengan ketentuan terbaik dalam memilih sekuen DNA primer.

2. Real Time kuantifikasi Polymerase Chain Reaction (RT qPCR)

Hasil desain DNA primer dilakukan amplifikasi dengan DNA template pada sample jaringan dengan metoda qPCR untuk mengekspresikan gen yang akan dianalisis. Hasil amplifikasi gen cygb terukur secara kuantitatif dengan menghitung jumlah ekspresi RNA dengan penghitungan secara kuantitatif dengan metoda livak.



Gambar 5. Melting curve pada beberapa hari perlakuan pertumbuhan ekor cecak



Gambar 6. Grafik amplifikasi cDNA sampel oleh DNA primer

Hasil amplifikasi gen *Cygb* menunjukkan adanya ekspresi gen tersebut pada beberapa hari perlakuan yang dihitung secara relative kuantitatif terhadap control dengan menggunakan rumus livak. Adanya proses amplifikasi DNA sampel ini menunjukkan bahwa DNA primer hasil desain dengan menggunakan metoda multiple alignmen berhasil diidentifikasi, sehingga terjadi penggabungan berpasangan DNA template dengan DNA primer. Metoda multiple alignment berhasil digunakan sebagai metoda dalam proses identifikasi gen yang unidentified dengan merancang DNA primer dari daerah sekuense yang memiliki daerah konservasi cukup tinggi, sehingga dihasilkan gen *cygb* yang spesifik untuk *Hemidactylus Platyurus*.

Tampak adanya ekspresi gen pada hari ke 1, ke 5, dan ke 13, hal ini menunjukkan pada hari tersebut gen *cygb* diduga memiliki peranan yang cukup berarti dalam proses regenerasi jaringan.

Tabel 1. Nilai relative kuantitatif ekspresi gen *Cygb* pada hari pengamatan pertumbuhan jaringan ekor cecak

No	Hari	Nilai kuantitatif relative ekspresi gen terhadap control
1	1	6,183113
2	3	0,989657
3	5	5,742451
4	8	0,646176
5	10	0,66588

6	13	1,059463
7	17	0,108442
8	21	0,175353
9	25	0,191445
10	30	0,134748

3. Analisis Statistika

Hasil uji normalitas dengan uji Kolmogorov smirnov menunjukkan data ekspresi gen Cygb pada setiap hari pertumbuhan jaringan ekor cecak menunjukkan hasil data yang berdistribusi normal dengan nilai sig (2 tailed) 0,096 yang berarti data berdistribusi dengan normal.

Tabel 2. Uji normalitas Kolmogorov-Smirnov Test

		cygb
N		10
Mean		1,589672
Std. Deviation		8
Normal Parameters(a,b)		2,333242
		21
Most Extreme Differences	Absolute	,390
	Positive	,390
	Negative	-,263
Kolmogorov-Smirnov Z		1,233
Asymp. Sig. (2-tailed)		,096

Test distribution is Normal.

Menganalisis adanya perbedaan yang cukup berarti dari ekspresi gen cygb pada setiap hari pertumbuhan jaringan ekor cecak (*Hemidactylus Platyurus*) menggunakan uji statistika uji Anova. Uji ini dilakukan untuk menganalisis peranan gen tersebut dalam proses regenerasi jaringan.

Tabel 3. Uji beda statistika Anova

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48,996	9	5,444	.	.
Within Groups	,000	0	.	.	.
Total	48,996	9			

Dari hasil uji Anova, diperoleh hasil sig sebesar 0,000 yang menunjukkan terdapatnya perbedaan nilai kuantitatif relative ekspresi gen pada setiap hari pertumbuhan jaringan ekor yang berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa gen *cygb* memiliki keterkaitan dengan proses regenerasi jaringan yang harus diteliti lagi lebih lanjut.

4. Luaran Penelitian

Luaran dari penelitian ini adalah :

1. Publikasi jurnal nasional tidak terakreditasi
2. Call for paper seminar nasional
3. Haki (Hak Kekayaan Intelektual)

BAB 5.KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Identifikasi *Unidentified* gen *Cygb Hemidactylus Platyurus* berhasil dilakukan dengan metoda multiple alignment dari beberapa spesies kekerabatan terdekat menggunakan software MEGA 7. Terbukti dengan adanya proses amplifikasi gen secara spesifik dengan gen *Cygb* yang terdapat dalam sampel jaringan. Hasil uji statistika, data ekspresi relatif kuantitatif terhadap control menunjukkan adanya perbedaan nilai tersebut pada setiap hari pertumbuhan jaringan ekor cecak. Diduga terdapat peranan gen tersebut dalam proses pertumbuhan jaringan ekor cecak.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini antara lain :

1. Untuk memastikan adanya ekspresi gen *Cygb* dalam regenerasi jaringan ekor cecak maka perlu dilakukan pemeriksaan Imuno Histo Kimia (IHK).
2. Perlu untuk dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan hambatan ekspresi gen tersebut, sehingga dapat dipastikan peranannya dalam proses regenerasi jaringan

REFERENSI

- Fausto N, Campbell JS, Riehlel K.J. Liver Regeneration. *Hepatology* 2006; Vol. 43 (2).
- Nakatani, Y., Kawakami, A. & Kudo, A. 2007. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev Growth Differ* 49: 145–154.
- Gauron C., C. Rampon¹, M. Bouzaffour, E. Ipendey, J. Teillon, M. Volovitch & S. Vríz. 2013. Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Scientific Reports*. 3: 2084.
- Halligan, K.E., F.L. Jour'heuil & D.Jord'heuil. 2009. Mechanisms of Signal Transduction: Cytoglobin Is Expressed in The Vasculature and Regulates Cell Respiration and Proliferation via Nitric Oxide Dioxygenation. *J. Biol. Chem.* 284: 8539-8547.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, & P. M. Williams. 1996. Genome Methods: Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994
- Hutchins, E.D., G.J. Markov, W.L. Eckalbar, R.M. George, J.M. King, M.A. Tokuyama, R.E. Fisher, J. Wade, D.F. DeNardo, J.A. Rawls, M.J. Huentelman, J. Wilson-Rawls, & K. Kusumi. 2014. Transcriptomic Analysis of Tail Regeneration in the Lizard *Anolis Carolinensis* Reveals Activation of Conserved Vertebrate Developmental and Repair Mechanisms. *PLOS ONE* . 9 (8).
- Jusman, S.W.A., C. Febriana, Iswanti, D. Fransiscus, F. Ferdinal, S.I. Wanandi, & M. Sadikin., 2014. Cytoglobin expression in oxidative stressed liver during systemic chronic normobaric hypoxia and relation with HIF-1 α . *Med J Indones*. Vol. 23 :No. 3.
- Ke, Q. & M. Costa. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 70:1469-1480.
- Kumar, A., R. Rani & A. Goel. 2014. Role of PCR in diagnosis. *Bio Evolution.* 6 : 23-24.
- Love, N. R. et al. 2011. Genome-wide analysis of gene expression during *Xenopus tropicalis* tadpole tail regeneration. *BMC Dev Biol.* 11(70).
- Lukman, A. 2009. Mekanisme Regenerasi Anggota Tubuh Hewan. *Biospecies.* 2 (2); 43 –47.
- McRonal, F.E., J. M. Risk, N. J. Hodges. 2012. Protection from Intracellular Oxidative

Stress by Cytochrome in Normal and Cancerous Oesophageal Cells.e- journal *Plos One*. 7 (2).

Prabhakar, N.R. & Semenza, G.L. 2012. Description and Physical Characteristics of Reptiles: Adaptives and Maladaptive Cardiorespiratory Respons to Continous and Intemittent Hypoxia Mediated Hipoxia-Inducible Factor 1 and 2. *Physiological Review* Published, Vol 92. : 967-1003.

Prigione, A. & J. Adaye. 2014. A mitochondrial strategy for safeguarding the reprogrammed genome. *Cell*.

Sheerer N., N. Dehne, C. Stockman, S. Swoboda, H.A. Baba, A. Neugebauer, R.S. Johnson & J. Fandrey.2013. Myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 α ; is Essential for Skeletal Muscle Regeneration in Mice.*J Immunol*.191:407-414.

Singh, S., S.M. Manda, D. Sikder, M.J. Birrer, B.A. Rothermel, D.J. Garry & P.P.A.Mammen. 2009. Transcription, Chromatin and epigenetics: Calcineurin activates cytochrome transcription in hypoxic myocytes. *J. Biol. Chem*. Vol. 284 : 10409-10421.

Soesilo, N.P. 2009. Regenerasi Ekor Kadal (*Eutropis multifasciata* Kuhl) dan prospek aplikasinya. Pidato Pengukuhan Guru Besar. Dept. Biologi UGM, Yogyakarta.

Wan, C., S. R. Gilbert, Y. Wang, X. Cao, X. Shen, G. Ramaswamy, K.A. Jacobsen, Z. S. Alaqi, A.W. Eberhardt, L. C. Gerstenfeld, T. A. Einhorn, L.Deng, &T. L. Clemens. 2008. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 accelerates bone regeneration. *PNAS*. 105(2).



