

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ilmu tentang TE (*Tissue Engineering*) menggunakan sel punca yang berdiferensiasi semakin berkembang dengan menggunakan metode *in vitro* yaitu kultur jaringan yang berasal dari jaringan primer. Proses TE sendiri melibatkan regenerasi jaringan, proliferasi dan diferensiasi yang cukup kompleks, serta terdiri dari banyak faktor. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa proliferasi dan diferensiasi sel kultur dipengaruhi oleh kondisi pada saat kultur. Penerapan *tissue engineering* dengan sel punca dari jaringan yang mudah didapatkan banyak diteliti karena memiliki kemampuan dalam berdiferensiasi (de Kemp *et al.*, 2015).

Sel punca bisa berasal dari hiPS dan hES (*human embryonic Stem cell*). Sel punca pluripoten yang diinduksi atau hiPS (*human induced Pluripotent Stem cell*) merupakan jenis sel punca pluripoten yang diinduksi dari sel somatik (fibroblas). Sifat pluripoten merupakan sifat yang dimiliki oleh sel punca dalam beregenerasi menjadi berbagai jenis sel dewasa. Sifat pluripoten sel ini diatur oleh faktor transkripsi utama berupa gen SOX2 (*Sex-determining region Y [SRY]-box 2*) (Müller *et al.*, 2016). Gen SOX2 berperan sebagai *regulator* penting dalam proses perkembangan dan spesifikasi suatu sel dengan menginduksi atau menstimulasi sifat pluripoten sehingga menghasilkan hiPS (Thanan *et al.*, 2012) (Zhang, 2014) (Müller *et al.*, 2016). Proses diferensiasi hiPS menjadi *Definitive Endoderm* (DE) merupakan tahapan dalam pembentukan urothelial. Penelitian sebelumnya memperlihatkan kemampuan hiPS dalam berdiferensiasi menjadi urothelium kandung kemih (Kang *et al.*, 2014). Penelitian yang sama menunjukkan bahwa proses DE diatur oleh faktor transkripsi berupa gen CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) yang kemudian menjadi tahapan awal dalam pembentukan urothelial (Kang *et al.*, 2014).

Sejauh ini, sel fibroblas paling sering digunakan untuk pemrograman ulang dalam membentuk hiPS. Selain potensi dari sel fibroblas itu sendiri, sel fibroblas mudah untuk didapatkan. Pemrograman ulang hiPS dilakukan pada penggunaan fibroblas kulup (*circumcision*) yang berasal dari kulit sunat manusia. Sel fibroblas

kulup lebih mudah untuk didapatkan jika dibandingkan fibroblas janin yang sejauh ini telah dilakukan pada penelitian sebelumnya.

Analisis ekspresi gen dari kedua faktor transkripsi diatas, perlu dilakukan guna mendeteksi keberadaan gen SOX2 dan gen CXCR4 yaitu dengan penggunaan RT-PCR. Langkah penting dalam analisis ekspresi gen yaitu desain primer yang spesifik terhadap gen SOX2 dan gen CXCR4 pada genom sel target (Carson *et al.*, 2012). Desain primer dilakukan dengan studi *in silico* menggunakan pendekatan komputasi untuk menghasilkan primer yang baik. Pada umumnya, studi *in silico* menggunakan *database* yang telah tersedia sebagai objek penelitian untuk identifikasi sel target yang akan diuji (Saraswati *et al.*, 2019). Pengujian hasil studi *in silico* dilakukan dengan penggunaan *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) guna, karena sensitivitasnya, potensi *throughput* yang tinggi, serta kuantifikasi yang akurat, dan potensi otomatisasi tingkat tinggi (Ragni *et al.*, 2013). Berdasarkan dengan penelitian sebelumnya yang telah berhasil memenuhi persyaratan utama primer yang baik untuk mengoptimalkan amplifikasi gen SOX2 untuk deteksi pluripotensi untuk *Mus musculus*. Namun, laboratorium basah perlu dilakukan untuk validasi primer untuk mengoptimalkan deteksi pluripotensi dalam mendesain dan menganalisis primer oligonukleotida secara *in silico* untuk mengamplifikasi gen SOX2 untuk deteksi pluripotensi (Naroeni *et al.*, 2022).

Analisis ekspresi gen dilakukan dengan membandingkan nilai *quantification cycle* (Cq) (Marabita *et al.*, 2016). Identifikasi dengan PCR konvensional kurang direkomendasikan dalam penelitian ini dikarenakan hasil ditunjukkan secara kualitatif, sehingga akan sulit untuk melihat spesifikasi nilai perbandingan ekspresi gen faktor transkripsi SOX2 dan CXCR4 jika pada kondisi yang berbeda karena nilai ekspresi yang ditampilkan tidak spesifik (Inayatullah *et al.*, 2021).

Identifikasi ekspresi gen SOX2 dan CXCR4 belum pernah dilakukan pada pengujian sebelumnya dengan sel fibroblas manusia untuk memudahkan pembentukan sel urothelial. Oleh karena itu, pada pengujian kali ini akan dilakukan optimasi primer gen SOX2 dan CXCR4 pada sel fibroblas manusia dengan menggunakan pengujian berbasis RT-PCR untuk kuantifikasi ekspresi gen SOX2 dan CXCR4. Hasil dari optimasi primer ini diharapkan dapat memudahkan

penelitian berikutnya dalam identifikasi ekspresi faktor transkripsi pada sel puca dan sel endoderm guna pengembangan urothelial.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah desain primer secara *in silico* dapat digunakan dalam deteksi gen SOX2 dan gen CXCR4 pada sel fibroblas manusia?
2. Pada suhu annealing berapakah primer tersebut dapat teramplifikasi secara optimum?
3. Bagaimana laju transkripsi gen SOX2 dan CXCR4 pada sel fibroblas manusia?

## 1.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Ho: Konstruksi primer yang telah didesain tidak dapat mendeteksi gen SOX2 dan gen CXCR4 pada sel fibroblas manusia menggunakan RT-PCR.
2. Ha: Konstruksi primer yang telah didesain berhasil mendeteksi gen SOX2 dan gen CXCR4 pada sel fibroblas manusia menggunakan RT-PCR.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan umum dilakukannya penelitian ini adalah pengembangan metode dalam identifikasi ekspresi secara kuantitatif dengan menggunakan primer spesifik untuk rekayasa jaringan. Adapun tujuan khusus dari penelitian, yaitu:

1. Mengetahui desain primer secara *in silico* sudah tepat untuk dalam deteksi gen SOX2 dan gen CXCR4 pada sel fibroblas manusia.
2. Mengetahui optimal suhu annealing untuk primer dapat teramplifikasi.
3. Mengidentifikasi laju transkripsi gen SOX2 dan CXCR4 pada sel fibroblas manusia.

## 1.5 Manfaat Penelitian

1. Membantu pendeteksian gen SOX2 dan gen CXCR4 terkait pluripotensi dan diferensiasi endoderm pada sel fibroblas manusia.
2. Membantu pengujian lebih lanjut untuk pengembangan rekayasa jaringan urothelium dari sel fibroblas manusia yang di reprogram menjadi sel Punca.