

Morfologi dan Tingkat Ekspresi Molekuler Mamosfir Asal Sel Kelenjar Susu *Macaca fascicularis* yang Diiradiasi Sinar Gamma Sebagai Model Onkogenesis

Iin Indriawati^{1*}, Fitriya Nur Annisa Dewi¹, Silmi Mariya¹, Iin Kurnia Hasan Basri³, Teja Kisananto³, Dwi Ramadhani³, Irma Herawati Suparto^{1,2}

¹Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor, Jalan Lodaya II/ 5 Bogor 16151, Indonesia

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Kampus Dramaga, Jalan Raya Dramaga Bogor, Indonesia

³Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR) BATAN, Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta, Indonesia

* Corresponding author:

e-mail: indriawati.iin@gmail.com

Received: 05-01-2021

Received in revised form: 12-06-2021

Accepted: 21-06-2021

DOI : 10.17146/jstni.2021.22.1.6141

Keywords: Iradiasi sinar gamma, *Macaca fascicularis*, mamosfir, onkogenesis

Abstract: Sel punca memiliki peran penting dalam perkembangan jaringan normal maupun onkogenesis, termasuk pada kejadian kanker payudara. Keterkaitan sel punca dan pembentukan kanker payudara perlu diteliti agar dapat ditemukan metode pencegahan dan terapi baru yang efektif. Teknik kultur mamosfir telah terbukti memperkaya populasi sel punca pada sel kelenjar susu manusia dan satwa primata. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan model onkogenesis kelenjar susu secara *in-vitro* dengan induksi sinar gamma pada kultur mamosfir yang berasal dari kelenjar susu monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*). Analisis morfologi sfir dan uji imunofluoresensi untuk γ -H2AX dilakukan setelah pajanan iradiasi 4 Gy selama 62 detik pada kultur mamosfir. Penanda molekuler sel punca dewasa dan sel punca kanker dievaluasi menggunakan qRT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma menimbulkan kerusakan DNA (double strand break) di dalam sel-sel penyusun mamosfir. Pajanan radiasi juga mengubah morfologi sfir. Ekspresi penanda untuk sel punca dewasa kelenjar susu (CD49f atau Integrin Alpha 6; ITGA6) dan sel punca kanker (CD133 atau Prominin-1; PROM1 dan CD44) lebih tinggi pasca iradiasi dibandingkan dengan kontrol. Temuan ini menunjukkan bahwa kultur mamosfir iradiasi yang berasal dari kelenjar susu monyet berpotensi dikembangkan sebagai model *in-vitro* untuk studi onkogenesis, terutama yang berkaitan dengan deregulasi sel punca dan risiko kanker payudara.

PENDAHULUAN

Kanker payudara merupakan kanker yang paling umum terjadi pada wanita dan penyebab kematian tertinggi pada wanita di seluruh dunia (1). Kanker ini berasal dari transformasi sel epitel kelenjar susu yang ditemukan pada saluran atau lobus kelenjar penghasil susu. Kelenjar susu mengandung sel punca dewasa yang bersifat multipoten, memiliki kemampuan *self renewal* dan diduga merupakan target utama transformasi untuk menjadi kanker payudara (2). Salah satu mekanisme yang diduga berperan dalam onkogenesis pada jaringan payudara adalah deregulasi sel punca kelenjar susu menjadi sel punca kanker karena keduanya memiliki jalur regulator molekuler yang sama (3) (4). Penelitian tentang sel punca kelenjar susu sangat diperlukan untuk memahami patogenesis

kanker payudara dan mengembangkan strategi pencegahan dan pengobatannya.

Salah satu faktor risiko terjadinya kanker adalah pajanan radiasi. Radiasi dengan dosis dan laju tertentu dapat menyebabkan kerusakan DNA seperti perubahan basa, *cross linking*, dan pemutus ikatan kromosom yang menyebabkan mutasi (5) (6). Sinar *gamma* adalah bentuk radiasi pengion frekuensi tinggi, memiliki energi yang cukup untuk menghilangkan elektron (mengionisasi) dari atom atau molekul. Molekul terionisasi bersifat tidak stabil dan cepat mengalami perubahan kimiawi. Berbagai studi menunjukkan bahwa pajanan radiasi sinar *gamma* menyebabkan kerusakan DNA, khususnya kerusakan untai ganda (*double strand break/DSB*) DNA dan mekanisme reparasinya (7) (8). Akibatnya, terjadi kerusakan pada proses komunikasi sel pada

jaringan normal dan menyebabkan gangguan pada apoptosis dan proliferasi sel (8). Informasi mengenai efek pajanan radiasi sinar *gamma* pada populasi sel punca masih terbatas.

Penelitian kanker payudara secara *in vitro* umumnya dilakukan dengan menggunakan kultur sel kanker payudara yang sudah tersedia di pasaran. Kultur sel kelenjar susu normal dapat pula digunakan pada beberapa jenis studi yang berkaitan dengan pencegahan kanker. Kultur sel kelenjar susu normal merupakan suatu proses menumbuhkan dan memelihara sel pada lingkungan yang terkontrol, dengan sumber sel yang berasal dari jaringan kelenjar susu normal. Namun, jenis sel yang tersedia untuk kepentingan tersebut sangat terbatas. Diperlukan suatu model asal hewan yang dapat memberikan gambaran kondisi payudara yang sama seperti pada manusia. *Macaca fascicularis* atau monyet ekor panjang (MEP) merupakan salah satu jenis satwa primata yang banyak digunakan dalam penelitian dan pengujian dan sebagai hewan model penyakit manusia. Spesies ini memiliki kemiripan dengan manusia pada aspek genetik, anatomi, proses perkembangan kelenjar susu, profil hormon dan reseptornya, serta dapat mengalami kejadian kanker payudara yang serupa (9) (10) (11).

Kelenjar susu MEP dapat menjadi sumber sel untuk dijadikan model kultur yang menggambarkan kondisi payudara manusia, termasuk sebagai sumber sel punca. Kelenjar susu MEP mengandung sel punca dewasa yang ditandai dengan ekspresi penanda khas sel punca, yakni CD29 (*Integrin beta-1; ITGB1*) dan CD49f (*Intergrin sub-unit alpha 6; ITGA6*) (12). Penggunaan sel punca dalam penelitian kanker payudara secara *in vitro* masih terbatas karena diperlukan teknik khusus untuk mengisolasi, memperbanyak sel dan mempertahankan sel dalam kondisi tidak terdiferensiasi. Salah satu teknik untuk memperkaya sel punca adalah kultur sel tiga dimensi yang dikenal sebagai mamofir. Kultur mamofir tumbuh membentuk koloni sel yang tidak menempel pada substrat tempat tumbuhnya secara *in vitro* (2). Populasi sel kelenjar susu MEP berhasil digunakan untuk membentuk mamofir ketika ditumbuhkan kembali setelah dibekukan, dan model kultur tersebut mampu meningkatkan populasi sel punca kelenjar susu (13). Kultur mamofir ini berpotensi dikembangkan sebagai model *in vitro* untuk mempelajari proses onkogenesis dengan induksi deregulasi proses diferensiasi sel punca menjadi sel epitel kelenjar susu. Untuk itu, informasi efek radiasi sinar *gamma* terhadap

populasi sel punca kelenjar susu dalam kaitannya dengan risiko patogenesis kanker payudara masih sangat diperlukan. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi efek pajanan radiasi terhadap pertumbuhan sel punca pada model mamofir.

TATA KERJA

Sampel yang digunakan adalah sediaan beku sel kelenjar susu dari tiga ekor monyet ekor panjang (MEP) *Macaca fascicularis* betina dewasa yang belum pernah bunting dan melahirkan (*nulliparous*). Sediaan sel beku tersebut merupakan sampel arsip yang diperoleh dari penelitian terdahulu (12), yakni sampel yang dikoleksi melalui teknik biopsi payudara MEP pada fase luteal siklus menstruasi. Seluruh prosedur dalam penelitian tersebut telah disetujui Komisi Pengawasan Kesejahteraan dan Penggunaan Hewan Penelitian Pengujian Penangkaran dan Pendidikan (KPKPHP4) PSSP LPPM IPB dengan nomor persetujuan: IPB PRC-15-B001.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain media penumbuh sel kelenjar susu (*Mammary Epithelial Growth Medium* (MEGM)) (Lonza, USA), media kultur mamofir *Mammoscult* (Stem Cell Technologies, USA), pencuci *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Invitrogen, USA) dan tripsin (Sigma, USA). Bahan untuk analisis antara lain kit ekstraksi RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany), primer (IDT, Singapore), *iScript cDNA Synthesis Kit*, dan *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad Laboratories, USA). Antibodi yang digunakan antara lain anti γ -H2AX (Invitrogen, USA) dan 53BP1 (Invitrogen, USA).

Peralatan

Alat yang digunakan untuk iradiasi adalah iradiator Gamma Chamber 4000 A (India). Alat-alat yang digunakan untuk analisis antara lain pelat kultur enam sumur (Corning, USA), pelat kultur enam sumur *ultra-low attachment surface* (Corning, USA), *Biological safety cabinet* (Nuair, Germany), inkubator CO₂ (Binder, Germany), alat sentrifugasi (Tommy, Japan), mesin *thermocycler PCR* (Thermo Fisher Scientific, USA), mesin *quantitative PCR* (BioRad, USA), Gel Doc 2000 (Biorad, USA), mikroskop fluoresens Nikon Eclipse 50i (Nikon, Jepang) dengan program *Cytovision* (Leica Biosystems, Germany) dan komputer.

Kultur Mamosfir Kelenjar Susu MEP dan Iradiasi Sinar *Gamma* (γ)

Sel epitel kelenjar susu MEP dari tiga sediaan beku ditumbuhkan menggunakan pelat kultur enam sumur dalam media penumbuh untuk sel epitel kelenjar susu. Koloni sel diamati menggunakan mikroskop cahaya terbalik setiap hari dan kultur sel diganti media dalam tiga sampai empat hari, sampai terbentuk sel epitel kelenjar susu yang siap dipasase. Sel kelenjar susu ditumbuhkan dalam media kultur mamosfir dengan konsentrasi 50,000 sel menggunakan pelat kultur *ultra-low attachment surface*. Pelat kultur ditutup dengan parafilm dan diinkubasi pada suhu 37 °C dan CO₂ 5%. Media kultur mamosfir diganti pada hari ke tiga.

Koloni mamosfir yang terbentuk dihitung pada masing masing pelat kultur dan pasase dilakukan pada hari ke tujuh. Sel dipindahkan ke dalam tabung 15 ml dan ditripsinasi kemudian disentrifugasi 390 xg selama lima menit, media dibuang dan ditambahkan kembali media baru. Setiap suspensi sel dibagi menjadi dua bagian; satu bagian untuk kelompok iradiasi yang diberi pajanan radiasi sinar *gamma* (γ) sampai dosis 4 Gray (Gy) dengan irradiator, dan satu bagian lainnya sebagai kelompok kontrol tanpa iradiasi sinar *gamma*. Jumlah sampel mamosfir yang dievaluasi adalah enam ($n=3$ per kelompok).

Mamosfir hasil iradiasi dan kontrol dipreparasi untuk deteksi marka molekuler dan uji imunofluoresensi. Selain itu mamosfir dikultur kembali; koloni mamosfir yang terbentuk dihitung pada masing masing pelat kultur, dan pasase dilakukan pada hari ke tujuh. Morfologi mamosfir sekunder dibandingkan antara kontrol mamosfir tanpa iradiasi dan mamosfir yang diberi pajanan radiasi, yakni pada hari ke tujuh setelah iradiasi. Mamosfir sekunder juga dipreparasi untuk deteksi marka molekuler dan uji imunofluoresensi.

Uji Imunofluoresens terhadap γ -H2AX

Uji imunofluoresens untuk γ -H2AX dilakukan pada mamosfir primer setelah enam jam dan enam hari dipajankan radiasi. Mamosfir ditumbuhkan menggunakan pelat kultur dan dikultur pada hari ke enam. Fiksasi sel dilakukan dengan menambahkan larutan formaldehida 2%. Antibodi pertama anti- γ -H2AX ditambahkan dengan konsentrasi 1:500 pada masing-masing sumur. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 45 menit sampai 1 jam. Antibodi kedua 53BP1 dengan DAPI ditambahkan pada masing-masing sumur, inkubasi dilakukan selama 30 menit. Pencucian dengan PBS dilakukan

sebanyak tiga kali masing-masing 15 menit. Hasil dari tahapan ini diamati menggunakan mikroskop fluoresens dengan filter hijau, merah dan biru. Analisis dilakukan menggunakan komputer dengan program *Cytovision*. Sel yang menunjukkan nilai positif γ -H2AX ditandai dengan pendaran foci yang teramati pada filter hijau dan filter merah.

Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

Evaluasi marka penanda sel punca kelenjar susu (*ITGB1* dan *ITGA6*) dan penanda sel punca kanker (*CD133* atau *Prominin-1*; *PROM1* dan *CD44*) dilakukan dengan metode *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction* (qRT-PCR) pada sampel mamosfir primer (enam jam dan 24 jam setelah iradiasi) dan mamosfir sekunder (setelah sub-kultur); masing-masing sampel dibuat duplo ($n=6$ per kelompok). Ekstraksi mRNA dilakukan pada kultur mamosfir menggunakan kit RNeasy. Konsentrasi mRNA diukur menggunakan spektrofotometer Nanodrop pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Sampel mRNA ditranskripsi balik menjadi untai cDNA menggunakan iScript cDNA Synthesis Kit. Prosedur ekstraksi mRNA dan reverse transkriptase PCR mengacu pada prosedur baku dari perusahaan. Pereaksi PCR menggunakan *SsoFast EvaGreen Supermix*, air bebas nuklease, primer (*forward* dan *reverse*) dan sampel cDNA. Primer yang digunakan terdapat pada Tabel 1.

Tahapan amplifikasi PCR terdiri atas pre denaturasi pada suhu 98 °C selama 30 detik, denaturasi 98 °C selama 5 detik dan *annealing* atau ekstensi pada suhu 50 °C selama 10 detik, diulang sebanyak 40 siklus.

Analisis Hasil Morfologi dan Tingkat Ekspresi Molekuler

Morfologi mamosfir yang terbentuk diamati secara mikroskopik sesudah iradiasi dengan mengukur diameter ukuran mamosfir antara 40 μ m - 110 μ m. Jumlah mamosfir dihitung secara mikroskopik pada setiap sumuran (14). Ekspresi marka γ -H2AX dengan metode imunofluoresens dievaluasi secara kualitatif dan dianalisis secara deskriptif. Hasil qRT-PCR dievaluasi dengan normalisasi nilai *cycle threshold* (Ct) terhadap nilai Ct *housekeeping gene* (*GAPDH*). Ekspresi gen dihitung dengan metode Δ Ct dan dinyatakan sebagai ekspresi relatif (dalam *fold-change* terhadap kontrol). Perbandingan tingkat ekspresi gen penanda sel punca kelenjar susu (*ITGB1* dan *ITGA6*) dan

penanda sel punca kanker (CD133 atau *Prominin-1*; *PROM1* dan *CD44*) dilakukan antara mamofir iradiasi dan tanpa iradiasi. Analisa statistik pada data kuantitatif dilakukan dengan metode *t-test* tidak berpasangan menggunakan perangkat Minitab 17.

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk uji qPCR terhadap marka sel punca kanker dan sel punca kelenjar susu

| Marka | Runutan Nukleotida (5'-3') | | Referensi |
|--------------|-------------------------------|---------|-----------------------------------|
| | Forward | Reverse | |
| <i>PROM1</i> | TCTTGAC | ACTTGAT | Tirino <i>et al.</i> 2011 (15) |
| | CGACTG | GGATGC | |
| | AGACCC | ACCAAG | |
| | AAC | CAC | |
| <i>CD44</i> | GCAGTTT | AGACTT | didisain oleh Ricky Fong 2014 |
| | GCATTG | GCTGGC | |
| | CAGTCA | CTCTCA | |
| | AC | TT | |
| <i>ITGB1</i> | GTTACAC | CTACTGC | Qiu L <i>et al.</i> 2012 (16) |
| | GGCTGC | TGACTTA | |
| | TGGTCTT | GGGATC | |
| <i>ITGA6</i> | CAAGAT | CTGAATC | Qiu L <i>et al.</i> 2012 (16) |
| | GGCTAC | TGAGAG | |
| | CCAGAT | GGAACC | |
| | AT | A | |
| <i>GAPDH</i> | CGGATTT | TCAAAG | Tian <i>et al.</i> 2010 (17) |
| | GGTCGT | GTGGAG | |
| | ATTGG | GAGTGG | |

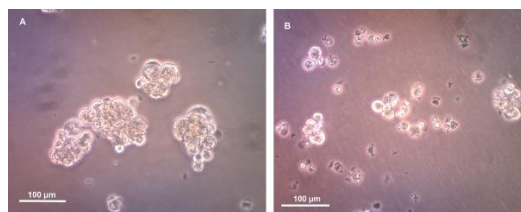
HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Mamofir

Sel epitel kelenjar susu dari sediaan beku berhasil ditumbuhkan kembali dengan konfluensi sel mencapai 100% pada hari ke lima sampai ke sembilan. Kelenjar susu merupakan struktur epitel bercabang dari kelenjar dan alveoli (18). MEP juga diketahui memiliki fase perkembangan kelenjar susu yang sama dengan manusia (11). Pengembangan sel epitel kelenjar susu MEP asal Indonesia sebagai sediaan model *in vitro* telah berhasil dilakukan (12). Penelitian ini berhasil mengkultur kembali sel kelenjar susu MEP dari sediaan beku. Sel kelenjar susu tersebut tumbuh menempel pada tempat tumbuhnya membentuk *monolayer* dengan morfologi *epithelial-like* dan

spindle. Profil ini serupa dengan kondisi kultur sel normal payudara manusia MCF-12A (19). Sel dapat tumbuh dengan baik. Kultur sel epitel kelenjar susu MEP selanjutnya berhasil ditumbuhkan dan dikultur dengan media mamofir. Mamofir yang terbentuk tumbuh tidak menempel pada substratnya, bersifat multiseluler, melayang-layang dalam media pertumbuhan dengan morfologi *spherical*.

Mamofir MEP diberi pajanan radiasi sinar *gamma* 4 Gy sebagai model proses onkogenesis. Morfologi mamofir pada tujuh hari setelah iradiasi dan tanpa iradiasi ditampilkan pada Gambar 1.

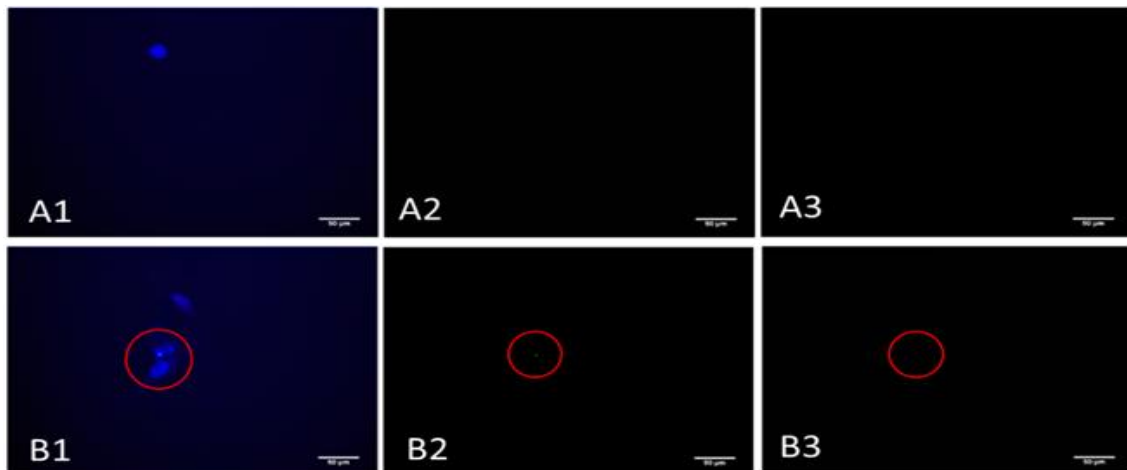


Gambar 1. Efek iradiasi pada morfologi kultur sel mamofir kelenjar susu MEP. (A) morfologi sel tanpa pajanan radiasi sinar *gamma* (B) hari ke tujuh pasca pajanan radiasi sinar *gamma*. Perbesaran 80 kali.

Secara morfologis, dapat dilihat perbedaan pada kumpulan sfer yang terbentuk antara mamofir yang telah dipajankan radiasi dan tanpa pajanan radiasi. Mamofir pada tujuh hari setelah pajanan radiasi sinar *gamma* terlihat berukuran lebih kecil dan tidak ada penumpukan sel sehingga memudahkan proses hitung sfer. Jumlah sfer lebih banyak pada mamofir yang diiradiasi yaitu 67.67 ± 11.98 sfer dibandingkan dengan 42.17 ± 5.27 sfer pada mamofir tanpa pajanan radiasi ($p < 0.05$). Peningkatan jumlah sfer akibat iradiasi diduga sejalan dengan peningkatan jumlah sel punca, baik sel punca kanker maupun sel punca kelenjar susu. Hasil ini konsisten dengan penelitian yang menunjukkan pengaruh pajanan sinar *gamma* dalam meningkatkan jumlah sfer pada kultur sel punca kanker hati manusia (20).

Imunofluoresens mamofir kelenjar susu MEP terhadap γ -H2AX

Hasil imunofluoresens memperlihatkan adanya pendaran foci γ -H2AX yang lebih dominan ditemukan pada sel mamofir kelenjar susu MEP yang dipajankan radiasi sinar *gamma* 4 Gy dibandingkan kontrol. Pendaran tersebut terdeteksi pada mamofir primer sampai enam hari setelah pajanan iradiasi (Gambar 2).



Gambar 2. Ekspresi penanda kerusakan DNA pada sel mamofir primer tanpa iradiasi (A1-A3) dan pada enam hari setelah iradiasi (B1-B3). Pendaran foci γ -H2AX + 53BP1 + DAPI (A1, B1), γ -H2AX (A2, B2) dan 53BP1 (A3, B3). Foci ditandai dengan lingkaran. Perbesaran 200 kali.

Pajanan radiasi dapat menyebabkan kerusakan pada DNA (21). Radiasi pengion dapat menyebabkan kerusakan untai ganda DNA (*double strand break/DSB*) secara langsung, dan dapat memicu kerusakan basa karena efek tidak langsung (22) (23). Fosforilasi protein H2AX (disebut γ -H2AX) terjadi sebagai mekanisme sel mengatasi kerusakan. Deteksi γ -H2AX umum digunakan sebagai penanda proses kerusakan sel terkait kanker akibat proses iradiasi maupun efek obat atau agen yang bersifat sitotoksik, dan merupakan marka yang relevan digunakan pada radioterapi dan pengobatan kanker (24). Hasil studi ini menunjukkan iradiasi sinar *gamma* dengan dosis 4 Gy mampu menginduksi lesio DSB pada populasi sel kelenjar susu MEP dalam mamofir. Mamofir merupakan kultur yang mampu memperkaya populasi sel punca; adanya pendaran γ -H2AX mengindikasikan bahwa sel punca MEP mengalami kerusakan DNA akibat iradiasi.

Ekspresi Marka Molekuler Sel Mamofir

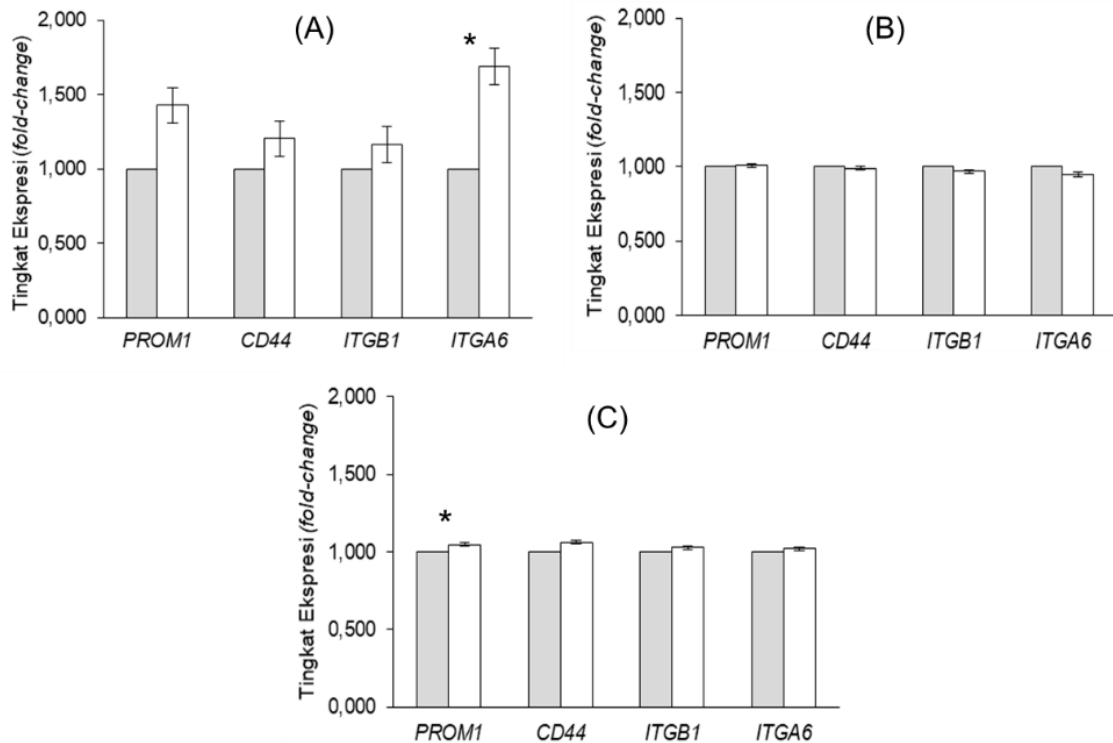
Uji ekspresi gen terhadap penanda sel punca kanker (*PROM1* atau penanda CD133 dan CD44) dan sel punca kelenjar susu (*ITGB1* atau penanda CD29 dan *ITGA6* atau penanda CD49f) dilakukan pada sel mamofir, yakni di fase mamofir primer pada enam jam dan 24 jam setelah iradiasi, dan pada fase mamofir sekunder atau turunan/sub-kultur mamofir primer (Gambar 3). Evaluasi efek iradiasi pada fase mamofir primer atau sfir turunan pertama dilakukan segera setelah iradiasi, yaitu dalam kurun waktu enam jam. Pajanan radiasi menunjukkan pola ekspresi gen yang terlihat

lebih tinggi pada semua marka sel punca yang diuji. Meskipun tidak berbeda secara statistik namun terdapat kecenderungan ekspresi marka sel punca kanker yang lebih tinggi pada 6 jam pasca iradiasi mamofir primer dibandingkan kontrol tanpa iradiasi. Hal ini sejalan dengan pola marka kerusakan DNA pada waktu yang sama, sehingga diperlukan studi lebih lanjut untuk mengetahui korelasi antara kerusakan DNA dan sel punca kanker. Perbedaan nyata terdapat pada penanda sel punca dewasa *ITGA6* (Gambar 3A) dengan tingkat ekspresi sebesar 1.69 kali dibandingkan sel tanpa iradiasi ($p < 0.05$). Evaluasi yang dilakukan pada 24 jam setelah iradiasi (Gambar 3B) tidak menunjukkan perbedaan ekspresi pada semua marka sel punca yang diuji. Hal ini mengindikasikan populasi sel punca kelenjar susu meningkat secara akut pasca iradiasi. Iradiasi dosis 5 Gy pada sel tumor kolorektal COLO-320 dilaporkan dapat meningkatkan ekspresi penanda sel punca dewasa *ITGB1* dan *ITGA6* secara signifikan. Ekspresi *ITGA6* meningkat sebesar 185% dalam waktu 12 jam setelah iradiasi dan *ITGB1* meningkat 35% dalam waktu 24 jam setelah iradiasi (25).

Efek iradiasi juga dievaluasi pada mamofir sekunder atau turunan mamofir primer yang dikultur lagi selama tujuh hari. Pada fase mamofir sekunder (Gambar 3C), mamofir kelenjar susu MEP yang terpajan radiasi sinar *gamma* 4 Gy menunjukkan ekspresi marka sel punca kanker *PROM1* (penanda CD133) bernilai 1.05 kali lebih tinggi ($p < 0.05$) dibandingkan dengan sel mamofir tanpa pajanan radiasi. Belum diketahui apakah perbedaan ekspresi

yang relatif kecil ini memiliki implikasi biologis yang menandakan efek berkepanjangan iradiasi berupa peningkatan sel punca kanker. Hal ini menarik mengingat hasil uji imunofluoresens γ -H2AX sel mamofir di periode ini masih menunjukkan adanya kerusakan DNA. Radiasi dilaporkan mampu meningkatkan jumlah sel

punca kanker pada model kultur sel kanker kolorektal manusia (HT-29) yang mengekspresikan CD133 pada 10-14 hari pasca iradiasi dengan dosis 5 Gy (26) dan juga mendorong ekspresi gen CD133 pada kultur sel kanker payudara (27).



Gambar 3 Grafik perbandingan efek iradiasi terhadap ekspresi gen penanda sel punca kanker (PROM1 dan CD44) dan sel punca dewasa (ITGB1 dan ITGA6) pada (A) mamofir primer 1, (B) mamofir primer 2, dan (C) mamofir sekunder. Tanda (*) menandakan perbedaan nyata ($p < 0.05$) pada mamofir yang diberi pajanan iradiasi dibandingkan dengan mamofir tanpa iradiasi. Data disajikan dalam bentuk rata-rata dengan *error bar* berupa SEM (*Standard error of the mean*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa iradiasi pada mamofir sel kelenjar susu MEP dapat mempengaruhi fenotip dan pola pertumbuhan mamofir serta menyebabkan kerusakan DNA sel sebagai salah satu indikator proses onkogenesis. Iradiasi juga menghasilkan efek jangka pendek (*immediate*) pada peningkatan sel punca kelenjar susu serta kemungkinan efek yang lebih lama berupa peningkatan sel punca kanker dibandingkan sel yang tidak dipajankan radiasi. Mekanisme yang diduga berperan adalah deregulasi sel punca kelenjar susu menjadi sel punca kanker yang meningkatkan resiko kanker payudara (3) (4). Mamofir bersumber sel kelenjar susu MEP berpotensi untuk terus dikembangkan sebagai model *in-vitro* untuk mempelajari proses

onkogenesis payudara yang melibatkan deregulasi sel punca.

KESIMPULAN

Mamofir diketahui sebagai model kultur sel yang dapat memperkaya populasi sel punca. Pajanan radiasi sinar *gamma* menimbulkan efek pada mamofir yang berasal dari sel kelenjar susu MEP berupa perbedaan ukuran dan jumlah kumpulan mamofir disertai kerusakan *double strand break* pada DNA sel mamofir. Perubahan ini terjadi seiring dengan peningkatan akut atau *immediate* pada ekspresi sel punca kelenjar susu *ITGA6* disertai indikasi adanya efek pada sel punca kanker. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mamofir kelenjar susu MEP yang dipajankan radiasi dapat digunakan sebagai model *in-vitro* untuk mempelajari onkogenesis

kelenjar susu yang melibatkan deregulasi sel punca.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kepada Pusat Studi Satwa Primata, LPPM IPB dan Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi - Badan Tenaga Nuklir Nasional (PTKMR BATAN).

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. 2015;386.
2. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003;17(10):1253–70.
3. Celià-Terrassa T. Mammary stem cells and breast cancer stem cells: Molecular connections and clinical implications. *Biomedicines.* 2018;6(2).
4. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(12):895–902.
5. Faraj KA, Elias MM, Al-Mashhadani AH, Baatout S. Effect of X- and gamma rays on DNA in human cells. *Eur J Sci Res.* 2011;53(3):470–6.
6. Ahmed RG. Damage pattern as a function of various types of radiation. *Int J Zool Res.* 2006;2(2):150–68.
7. Karimi-Busheri F, Rasouli-Nia A, Mackey JR, Weinfeld M. Senescence evasion by MCF-7 human breast tumor-initiating cells. *Breast Cancer Res.* 2010;12(3).
8. Lin YF, Nagasawa H, Peng Y, Chuang EY, Bedford JS. Comparison of several radiation effects in human MCF10A mammary epithelial cells cultured as 2D monolayers or 3D acinar structures in matrigel. *Radiat Res.* 2009;171(6):708–15.
9. Dewi FN, Wood CE, Lees CJ, Willson CJ, Register TC, Tooze JA, et al. Dietary soy effects on mammary gland development during the pubertal transition in nonhuman primates. *Cancer Prev Res.* 2013;6(8):832–42.
10. Dewi FN, Wood CE, Willson CJ, Register TC, Lees CJ, Howard TD, et al. Effects of pubertal exposure to dietary soy on estrogen receptor activity in the breast of cynomolgus macaques. *Cancer Prev Res.* 2016;9(5):385–95.
11. Cline JM, Wood CE. The Mammary Glands of Macaques. *Toxicol Pathol.* 2008;36(7_suppl):130S-141S.
12. Mariya S, Dewi FNA, Suparto IH, Wilkerson GK, Cline JM, Permanawati, et al. Mammary Gland Cell Culture of *Macaca fascicularis* as a Reservoir for Stem Cells. *HAYATI J Biosci.* 2017;24(3):136–41.
13. Mariya S, Dewi FN, Suparto IH, Wilkerson GK, Cline MJ, Iskandriati D, et al. Mammosphere Culture of Mammary Cells from *Cynomolgus Macaques (Macaca fascicularis)*. *Comp Med.* 2019;69(2):144–50.
14. Lombardo Y, de Giorgio A, Coombes CR, Stebbing J, Castellano L. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp.* 2015;2015(97):1–5.
15. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133 + cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo . *FASEB J.* 2011;25(6):2022–30.
16. Qiu L, Low HP, Chang CI, Strohsnitter WC, Anderson M, Edmiston K, et al. Novel measurements of mammary stem cells in human umbilical cord blood as prospective predictors of breast cancer susceptibility in later life. *Ann Oncol.* 2012;23(1):245–50.
17. Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma H, Ma PX, Atala A, et al. Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(5):870–7.
18. McNally Sara and Stein Torsten. Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods Mol Biol.* 2017;1501:149–64.
19. Sweeney MF, Sonnenschein C, Soto AM. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int.* 2018;18(1):1–12.
20. Ghisolfi L, Keates AC, Hu X, Lee D ki, Li CJ. Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS One.* 2012;7(8):1–11.
21. Hou YN, Lavaf A, Huang D, Peters S, Huq R, Friedrich V, et al. Development of an automated γ -H2AX immunocytochemistry assay. *Radiat Res.* 2009;171(3):360–7.
22. Aparicio T, Baer R, Gautier J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair (Amst).* 2014;19:169–75.

23. Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, Ji J, Bonner WM, Kinders RJ, et al. Histone γ H2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res.* 2010;16(18):4532–42.
24. Kuo LJ, Yang LX. γ -H2AX- A novel biomaker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Brooklyn).* 2008;22(3):305–10.
25. Meineke V, Gilbertz KP, Schilperoort K, Cordes N, Sendler A, Moede T, et al. Ionizing radiation modulates cell surface integrin expression and adhesion of COLO-320 cells to collagen and fibronectin in vitro. *Strahlentherapie und Onkol.* 2002;178(12):709–14.
26. Kawamoto A, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Morimoto Y, Fujikawa H, et al. Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy. *Exp Ther Med.* 2012;3(3):403–9.
27. Kim MH, Kim MH, Kim KS, Park MJ, Jeong JH, Park SW, et al. In vivo monitoring of CD44+ cancer stem-like cells by γ -irradiation in breast cancer. In: *International Journal of Oncology.* 2016. p. 2277–86.