

**ANALISIS EKSPRESI DAN IDENTIFIKASI LOKASI PROTEIN
CHD7 (WILD TYPE) PADA SEL HELA DAN HEK 293**

*EXPRESSION ANALYSIS AND LOCATION IDENTIFICATION OF
CHD7 PROTEIN (WILD TYPE) IN HELA AND HEK 293 CELLS*



Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Gara Samara Brajadenta
22010111400099**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2014

**ANALISI EKSPRESI DAN IDENTIFIKASI LOKASI PROTEIN
CHD7 (*WILD TYPE*) PADA SEL HELA DAN HEK 293**

Oleh

**Gara Samara Brajadenta
22010111400099**

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada tanggal 27 Februari 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing Utama

Pembimbing Kedua

Prof. Sultana MH Faradz, MD. PhD
NIP. 19520202 197901 2 001

Dr. dr. Tri Indah Winarni, PAK, M.Si.Med
NIP. 19630128 198902 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes
NIP. 19590527 198603 2 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong plagiarism sebagaimana dimaksud dalam Permendiknas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka

Semarang, 24 Februari 2014

Gara Samara Brajadenta
22010111400099

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Gara Samara Brajadenta
Tempat/tanggal lahir : Jakarta, 25 September 1985
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Bumi Bekasi Baru I : Lulus tahun 1997
2. SLTPN 2 Bekasi : Lulus tahun 2000
3. SMA Labschool Jakarta : Lulus tahun 2003
4. FK UNSOED Purwokerto : Lulus tahun 2010
5. FE UNWIKU Purwokerto : Lulus tahun 2009
6. Magister Manajemen Rumah Sakit UNSOED : Lulus tahun 2012
7. Master Biologie Santé, Sciences du Médicament
Universitas Poitiers, Prancis : Lulus tahun 2014
8. Magister Ilmu Biomedik UNDIP : Lulus tahun 2014

C. Riwayat Pekerjaan

1. Tahun 2010 – sekarang : Dosen Tetap FK UNSWAGATI Cirebon
2. Tahun 2010 – sekarang : Dokter Umum klinik pribadi

D. Riwayat Keluarga

1. Nama orang tua
Ayah : Ir. Samiun Achyar
Ibu : Dra. Juliningsih
2. Nama istri : Tri Atty Agustin, BA (Hons)
3. Nama anak : Shakila Azura Putri Brajadenta
Carissa Adiva Putri Brajadenta

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat dan karuniaNya penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Analisis Ekspresi dan Identifikasi Lokasi Protein CHD7 (*Wild Type*) Pada Sel HeLa dan HEK 293”. Tesis ini dibuat dengan tujuan memenuhi tugas dan melengkapi syarat dalam memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan serta uluran tangan dari berbagai pihak baik moral, maupun material. Oleh karena itu, pada kesempatan ini perkenankanlah penulis untuk menyampaikan ucapan terima kasih, penghargaan, serta rasa hormat kepada:

1. Prof. Sultana MH Faradz, MD, Ph.D, selaku pembimbing utama yang selalu berkenan meluangkan waktunya untuk memberikan bimbingan dan arahan serta atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan untuk mengikuti program *Double Degree* Indonesia-Prancis.
2. Dr. dr. Tri Indah Winarni, M.Si.Med, selaku pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam pembuatan tesis ini.
3. Prof. Dr. dr. Tri Nur Kristina, DMM, M.Kes selaku ketua penguji, yang telah meluangkan waktunya dan memberikan masukan-masukan yang bermanfaat.
4. dr. Farmaditya EP Mundhofir, M.Si.Med, Ph.D selaku penguji, yang telah meluangkan waktunya dan memberikan masukan-masukan yang bermanfaat.
5. Prof. Gérard Mauco, selaku wakil rektor Universitas Poitiers, Prancis dan penanggung jawab program *double degree* Indonesia-Prancis, yang telah berkenan memberikan kesempatan untuk mengambil Master 2 di Universitas Poitiers, Prancis.
6. Dr. dr. H. Affandi, Sp. A, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati Cirebon yang telah memberikan izin untuk melaksanakan tugas belajar.

7. Prof. Alain Kitzis. selaku kepala laboratorium genetika dan penyakit langka, Universitas Poitiers yang telah memberikan izin untuk melaksanakan penelitian di laboratoriumnya.
8. Dr. Vincent Thoreau selaku supervisor laboratorium, yang telah meluangkan waktunya dan dengan sabar mengajarkan teknik pemeriksaan biologi molekuler serta memberikan masukan-masukan yang bermanfaat.
9. Seluruh staf dan pegawai di laboratorium genetik dan penyakit langka Universitas Poitiers yang telah memberikan bantuan dan masukan kepada penulis.
10. Tri Atty Agustin, BA (Hons), istri tercinta yang selalu memberikan semangat dan dorongan.
11. Teman-teman angkatan 6, serta pihak-pihak yang telah membantu penulis namun tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Semoga amal dan kebaikan yang telah diberikan kepada penulis, mendapat balasan dari Allah SWT.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tesis ini masih belum sempurna serta banyak terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik membangun dari pembaca sekalian. Semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca serta kemajuan ilmu pengetahuan.

Semarang, 24 Februari 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
ABSTRAK.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. PENDAHULUAN	
1.1 . Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1. Tujuan Umum.....	3
1.3.2. Tujuan Khusus.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	4
1.5. Orisinalitas Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Sindroma CHARGE.....	6
2.2. Gen <i>CHD7</i>	9
2.3. Protein CHD7.....	10
2.4. Ekspresi Protein CHD7 Rekombinan.....	13
2.5. Kuantifikasi dan Identifikasi Lokasi Protein CHD7.....	14
2.6. Transformasi dan Transfeksi.....	14
2.7. <i>Western Blot</i>	15
2.8. Imunofluoresensi.....	18
III. KERANGKA TEORI, KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS	
3.1. Kerangka Teori.....	20
3.2. Kerangka Konsep.....	21
IV. METODE PENELITIAN	
4.1. Ruang Lingkup Penelitian.....	22
4.2. Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
4.3. Jenis dan Rancangan Penelitian.....	22
4.4. Populasi dan Sampel.....	22
4.4.1. Populasi.....	22
4.4.2. Sampel.....	23
4.5. Variabel Penelitian.....	23
4.6. Definisi Operasional.....	23
4.7. Alat dan Bahan.....	24
4.8. Cara Kerja.....	27

4.9. Alur Penelitian.....	34
4.10. Analisis Data.....	34
4.11. Etika Penelitian.....	35
V. HASIL PENELITIAN	
5.1. Verifikasi Hasil Transformasi dengan Gel Elektrophoresis dan Sequencing.....	37
5.2. Pengukuran Konsentrasi Protein CHD7 Total (<i>lysat</i>).....	38
5.3. Kondisi Optimal untuk Proses Transfeksi.....	40
5.4. Ekspresi Protein CHD7 dengan Teknik Western Blot.....	42
5.5. Identifikasi Lokasi Protein CHD7 dengan Teknik Imunofluoresensi.....	43
VI. PEMBAHASAN	
6.1. Pembahasan.....	45
6.2. Keterbatasan Penelitian.....	52
VII. KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1. Kesimpulan.....	53
7.2. Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	58
GLOSARIUM.....	61

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Penelitian-penelitian terdahulu tentang ekspresi dan lokasi protein CHD7.....	4
Tabel 2. Kriteria diagnosis klinis sindroma CHARGE.....	7
Tabel 3. Tabel kalibrasi jumlah protein (BSA) dan absorbansinya.....	39
Tabel 4. Jumlah Protein CHD7-HA yang terdeteksi di nukleoplasma sel HeLa.....	46
Tabel 5. Jumlah Protein CHD7-HA yang terdeteksi di nukleoplasma sel HEK 293.....	46
Tabel 6. Jumlah Protein FLAG-CHD7 yang terdeteksi di nukleoplasma sel HeLa.....	48
Tabel 7. Jumlah Protein FLAG-CHD7 yang terdeteksi di nukleoplasma sel HEK 293.....	49

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Kelainan dismorfik pada pasien sindroma CHARGE.....	8
Gambar 2. Lokasi gen <i>CHD7</i>	9
Gambar 3. Representasi domain protein CHD7.....	11
Gambar 5. Kerangka teori penelitian.....	20
Gambar 6. Kerangka konsep penelitian.....	21
Gambar 7. Analisis hasil transformasi dengan elektroforesis gel agarosa.....	37
Gambar 8. <i>Partial Electropherogram</i> sekuens gen <i>CHD7</i>	38
Gambar 9. Kurva standar larutan BSA.....	39
Gambar 10. Verifikasi efisiensi transfeksi dan ekspresi protein CHD7- HA pada sel HeLa dengan metode <i>western blot</i>	41
Gambar 11. Ekspresi protein FLAG-CHD7 pada sel HeLa dan sel HEK 293.....	43
Gambar 12. Visualisasi ekspresi protein CHD7-HA yang ditransfeksi ke dalam sel HeLa dan sel HEK 293 dengan menggunakan mikroskop konfokal.....	45
Gambar 13. Visualisasi ekspresi protein FLAG-CHD7 yang ditransfeksi ke dalam sel HeLa dan sel HEK 293 dengan menggunakan mikroskop konfokal.....	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Komposisi Gel Akrilamid.....	59
Lampiran 2. Komposisi Larutan Buffer SDS-PAGE.....	60
Lampiran 3. Antibodi yang digunakan.....	61

DAFTAR SINGKATAN

DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
RNA	: <i>Ribonucleic acid</i>
rRNA	: <i>Ribosomal ribonucleic acid</i>
CGH	: <i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CHARGE	: <i><u>C</u>oloboma, <u>H</u>ear defect, <u>A</u>tresia choanae, <u>R</u>etarded growth and <i>development, <u>G</u>enital hypoplasia, <u>E</u>ar anomalies/deafness</i></i>
CHD7	: <i>Chromodomain Helicase DNA-binding 7</i>
dNTP	: <i>Deoxyribonucleotide triphosphat</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
FISH	: <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
HA	: <i>HemAgglutinin</i>
HEK	: <i>Human Embryonic Kidney</i>
LB	: <i>Luria Bertani</i>
PBS	: <i>Phospate Buffered Saline</i>
PCR	: <i>Polymerisation Chain Reaction</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodécyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
WT	: <i>Wild type</i>

ABSTRAK

Latar Belakang: Sindroma CHARGE merupakan salah satu penyakit genetik langka yang ditandai dengan beberapa kelainan congenital yang disebabkan oleh *nonsense mutation* secara *de novo* pada gen *CHD7*. Studi-studi sebelumnya menunjukkan bahwa protein *CHD7* sebagian besar diekspresikan di nukleoplasma, namun beberapa studi terbaru membuktikan bahwa lokasi protein *CHD7* (*wild type*) adalah di nukleoplasma dan nukleolus. Penentuan lokasi ekspresi protein *CHD7* sangat penting untuk mempelajari fungsi dari protein tersebut dan selanjutnya dapat dikembangkan sebagai suatu tes fungsional pada protein *CHD7*, terutama pada gen *CHD7* yang mengalami mutasi.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari ekspresi protein *CHD7* dan mengkonfirmasi lokasi protein tersebut dengan menggunakan dua plasmid dan dua model seluler yang berbeda (sel HeLa dan HEK 293).

Metode: Tahapan awal penelitian ini adalah melakukan transfeksi dengan menggunakan dua plasmid: pCIneo-*CHD7*-HA dan pcDNA3-FLAG-*CHD7*. Untuk tujuan tersebut, dilakukan transfeksi kedalam dua model seluler: sel karsinoma serviks manusia (HeLa) dan sel embrionik ginjal manusia (HEK 293). Metode *western blot* digunakan untuk mempelajari ekspresi protein *CHD7* dan lokasi protein *CHD7* diidentifikasi dengan menggunakan teknik *Immunofluorescence*.

Hasil: Ekspresi protein *CHD7*-HA (*wild type*) dan FLAG-*CHD7* (*wild type*) ditemukan pada kedua model seluler (sel HeLa dan HEK 293). Penelitian ini menyimpulkan bahwa lokasi protein *CHD7* adalah di nukleoplasma dan bukan di nukleolus.

Kesimpulan: Ekspresi protein *CHD7* (*wild type*) dapat dibuktikan pada kedua model seluler (sel HeLa dan HEK 293), akan tetapi lokasi protein *CHD7* tersebut hanya dapat ditemukan di nukleoplasma sebagai regulator transkripsi.

Kata kunci: Sindrom CHARGE, protein *CHD7*, *western blot*, imunofluoresensi

ABSTRACT

Background: CHARGE syndrome is a genetic disease characterized by numerous congenital abnormalities caused by *de novo* nonsense mutation of CHD7 gene. Recent studies indicate that CHD7 (wild type) functions as a transcriptional regulator in nucleoplasm and CHD7 is also constitutively localized in nucleolus. Determination of the location of CHD7 protein expression is very important to study the function of proteins and can be developed as a functional test of the CHD7 protein, especially in mutated CHD7 gene.

Objective: The aim of this research is to study the expression of CHD7 protein and confirm the location of this protein using two plasmids and two different cell models (HeLa and HEK 293 cells).

Methods: Initial stages of this study were to conduct transfection using two plasmids: pCIneo-CHD7-HA and pcDNA3-FLAG-CHD7. To this purpose, a transfection of human cell lines: human cervix carcinoma cells (HeLa) and human embryonic kidney cells (HEK 293) was performed. Protein expression was demonstrated by western blot and location of CHD7 protein identified using immunofluorescence.

Results: The expression of CHD7-HA protein (wild type) and FLAG-CHD7 (wild-type) were found in both cell models (HeLa and HEK 293 cells). This research concluded that the location of CHD7 protein was found in the nucleoplasm and not in the nucleolus.

Conclusion: The expression of CHD7 protein (wild-type) can be demonstrated in both cell models (HeLa and HEK 293 cells), but the location of CHD7 protein only be found in the nucleoplasm as a transcriptional regulator.

Key words: CHARGE syndrome, CHD7 protein, immunofluorescence, western blot