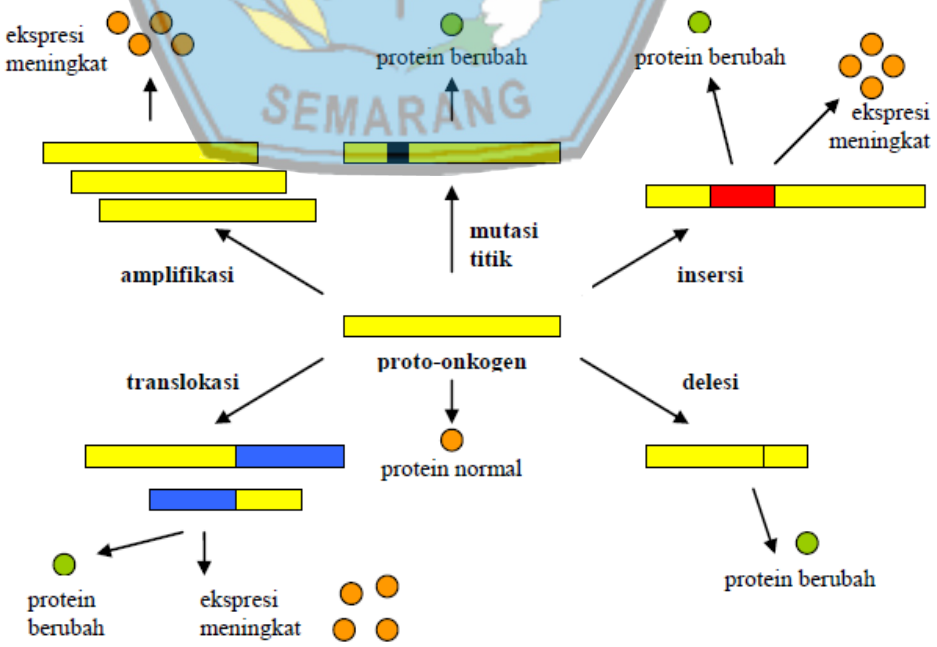
BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Karsinogenesis

Pada umumnya, kanker dapat timbul karena suatu paparan karsinogen secara berkali-kali dan adiptif pada dosis tertentu, akan tetapi tidak menutup kemungkinan pada keadaan tertentu dapat juga timbul dari dosis tunggal karsinogen (Kartawiguna, 2001). Gen yang berperan mengatur pertumbuhan sel normal disebut dengan protoonkogen (Leonardo, 2005). Protoonkogen dapat memicu pembelahan sel dari berbagai jalur. Protoonkogen akan berubah menjadi onkogen (Vlahopoulos et al, 2008). Onkogen tersebut menyebabkan sel untuk membelah secara luas dan tidak terkontrol akibat aktivitas yang ditimbulkan (Leonardo, 2005). Sebagian besar kanker berasal dari sel epitel yang melapisi organ dan disebut dengan *carcinoma* (Ledford, 2011).



Gambar 1. Mekanisme Aktivasi Onkogen (Tan, 2010)

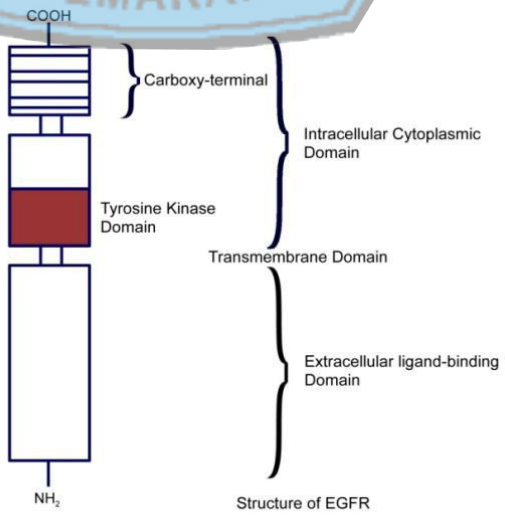
repository.unimus.ac.id

2.2 HER2

HER2 yang disebut juga dengan HER2/neu, ErbB 2 atau c-ErbB 2 merupakan protein yang normal dan berfungsi mengatur pertumbuhan. Reseptor HER2/neu dapat ditemukan pada permukaan membran, transmembran dan sitoplasma sel. Reseptor HER2/neu ini memiliki peranan sebagai kontrol pada pembelahan sel. Perubahan genetik yang ada pada gen HER2 akan memproduksi reseptor faktor pertumbuhan pada permukaan sel tumor (Kamarlis, 2009). Fungsi HER2 berperan sebagai reseptor pertumbuhan, deferensiasi dan proliferasi sel. kromosom pada gen HER2 mencode protein trans-membran dengan aktivasi tirosin kinase. (Suwiyoga, 2013)

2.2.1 Struktur HER2/neu

HER2/neu merupakan glikoprotein transmembran tipe 1 yang terdiri dari tiga bagian : *N-terminal extracelluler domain* (ECD), *single α-helix transmembrane domain* (TM) dan *intracelluler tyrosine kinase domain* (Suwiyoga, 2013)



Gambar 2. Struktur HER2/neu. (Suwiyoga, 2013)

repository.unimus.ac.id

2.2.2 Mutasi Gen HER2/neu

HER2/neu memegang peranan penting pada semua tingkatan perkembangan sel. mutasi atau overekspresi HER2/neu dapat menyebabkann tumorigenesis dan juga metastase. HER2/neu awalnya ditemukan sebagai onkogen pada tikus dengan neuroglioblastoma yang diinduksi secara kimiawi, dimana sebuah titik mutasi pada molekul transmembran domain memicu aktivasi onkogen. pada manusia, HER2/neu proto-onkogen diaktifkan menjadi onkogen bukan melalui sebuah titik mutasi, tetapi melalui mekanisme amplifikasi gen sehingga menimbulkan overekspresi.(Ling KS et al, 2005)

2.3 Imunohistokimia (IHC)

IHC merupakan suatu proses untuk menetukan letak atau lokasi dan jenis protein (antigen) yang berada di dalam sel-sel jaringan (Hastuti dan Lubis 2011). Prinsip dari IHC adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai dengan adanya reaksi antara antibodi dan antigen, sedangkan reaksi kimiawi ditandai dengan adanya reaksi antara enzim dan substrat (Sudiana, 2005).

2.3.1 Tahap dasar IHC

`Tahapan dasar dalam melakukan pemeriksaan IHC pada umumnya ada beberapa tahapan dasar, yaitu :

2.3.1.1 Fiksasi dan *Procesing* jaringan

Pada pengecatan IHC, larutan fiksasi yang digunakan adalah buffer formalin 10%. Buffer formalin yang digunakan berada dalam suasana netral atau pH

repository.unimus.ac.id

diantara 7-7,4 selama 24-72 jam (Sudiana 2005). *Procesing* jaringan sendiri meliputi beberapa tahapan, yaitu fiksasi, dehidrasi dan penanaman jaringan pada blok parafin atau yang sering disebut dengan *embedding* (Muntiha, 2001).

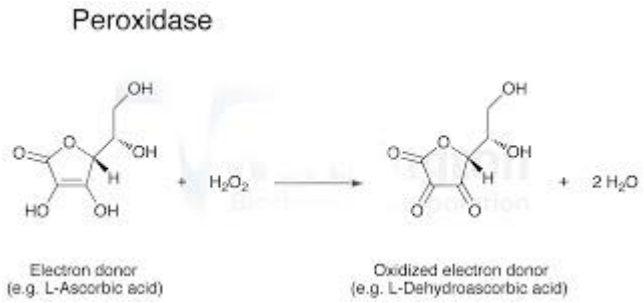
2.3.1.2 Antigen retrieval

Metode antigen retrieval (AR) yang sering digunakan dalam pengecatan IHC adalah metode enzimatik dan *heat-induced epitope retrieval* (HIER). Larutan yang sering digunakan dalam proses HIER seperti TBS dan citrate buffer. Biasanya slide preparat direndam larutan tersebut dan dipanaskan dengan suhu dan waktu tertentu baik dengan cara di *microwave*, *boiling*, *steamer*, *waterbath* dan *incubator* (Ramos-Vara, 2005). Proses antigen retrieval ini bertujuan mengembalikan struktur antigen yang rusak pada saat proses fiksasi (Dabbs, 2013).

2.3.1.3 Endogenus *Blocking*

Proses *endogenous blocking* merupakan sesuatu yang sangat penting dalam proses pengecatan IHC. Tingkat kerentanan enzim dalam mengalami denaturasi dan inaktivasi selama proses fiksasi sangat bervariasi. Positif palsu juga dapat terjadi akibat adanya *endogenous peroxidase* dimana *peroxidase* pada jaringan dapat bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama DAB menimbulkan warna coklat pada sel yang mengandung *endogenous perosidase* (Irawan, 2015).

repository.unimus.ac.id



Gambar 3. Reaksi *Peroxidase* terhadap H_2O_2 (Irawan, 2015)

2.3.1.4 Protein *Blocking*

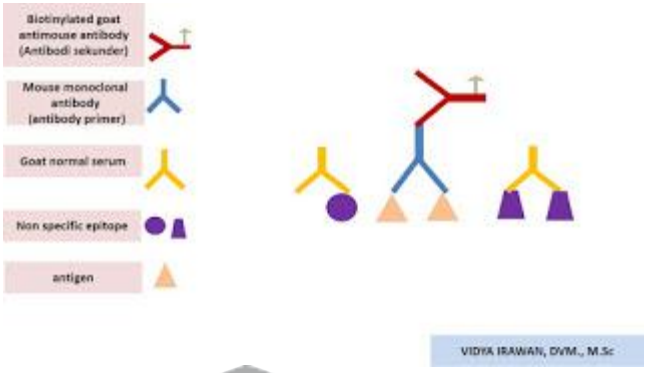
Protein *blocking* dilakukan sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik yang terdapat pada jaringan saat pengecatan IHC. Protein *blocking* berperan untuk meminimalisir protein non-spesifik yang berkompetisi dalam mengikat antibodi yang ada dalam jaringan.

Beberapa *blocking agent* untuk protein blocking menurut Radig (2013), yaitu :

a. Normal serum

Normal serum merupakan *blocking agent* yang umum digunakan pada teknik IHC. Tujuan aplikasi normal serum pada prosedur IHC adalah untuk mengikat ikatan non spesifik. Sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen pada jaringan, ikatan non spesifik pada jaringan harus dilakukan *blocking* untuk mencegah antibodi berikatan dengan epitop yang non spesifik (Irawan 2015). *Normal serum* dapat dikatakan sebagai blocking agent yang baik, akan tetapi kelemahan pada normal serum ini adalah harganya yang relatif mahal.

repository.unimus.ac.id



Gambar 4. *Blocking background* menggunakan *normal serum* (Irawan 2015)

b. Protein solution

Selain menggunakan normal serum sebagai *blocking agent*, beberapa *protein solution* dapat digunakan sebagai *blocking agent*, yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA) 0,1-5%, gelatin dan susu skim.

c. *Commercial* Mixes

Commercial blocking agent yang terdapat di pasaran memiliki banyak ragam. Buffer ini memiliki tingkat kemurniaan yang sangat tinggi terhadap protein, karena berasal dari protein tunggal atau protein bebas.

2.3.1.5 Inkubasi Antibodi

Antibodi merupakan suatu senyawa kompleks yang selalu berikatan dengan antigen. Antibodi yang digunakan untuk pengecatan IHC diperoleh hasil induksi dari hewan yang nantinya antobodi secara spesifik berikatan dengan antigen atau protein yang secara khusus antigen tersebut akan menciptakan atau memunculkan respon imun dalam jaringan. Antibodi yang digunakan dalam

repository.unimus.ac.id

inkubasi dapat menggunakan antibodi monoklonal maupu antibodi poliklonal yang didapat dari imunisasi dengan antigen pada hewan (Dabbs, 2013).

2.4 Metode pengecatan IHC

Sistem deteksi atau metode dalam melakukan pengecatan IHC yang dapat digunakan untuk memperlihatkan atau menampilkan antigen dalam jaringan, yaitu (Ramos-vara, 2005):

2.4.1 Metode langsung (*Direct*)

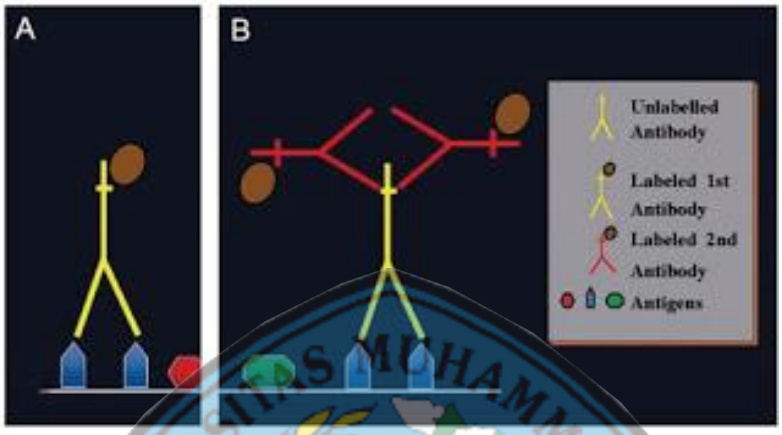
Metode yang hanya menggunakan satu jenis antibodi yang berikatan secara kovalen pada antibodi primer (Innova biosciense, 2010). Antibodi primer yang telah berlabel akan bereaksi langsung dengan antigen pada preparat sitologi maupun histologi untuk mengenali antigen spesifiknya yang terdapat pada sel jaringan (Howard dan Kaser, 2014 ;Bancroft dan Gamble, 2008). Kelemahan metode direct adalah amplifikasi sinyal atau pewarnaan kurang memadai dan kurang sensitif untuk permintaan diagnosa (Irawan, 2015).

2.4.2 Metode tidak langsung (*Indirect*)

Metode *indirect* lebih rumit dan lama pengerjaannya apabila dibandingkan dengan metode direct yang digunakan dalam pengecatan IHC (Howard dan Kaser, 2014). Metode *indirect* labelling akan melekat secara kovalen pada antibodi sekunder, dimana antibodi sekunder akan melekat dengan antibodi primer saat proses immunoassay (Innova biosciense, 2010). Kelebihan dari metode *indirect* adalah memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi yaitu beberapa ribu kali lebih sensitif dari pada metode *direct* sehingga

repository.unimus.ac.id

metode *indirect* saat ini lebih banyak digunakan dalam pemeriksaan IHC (Howard dan Kaser, 2014).

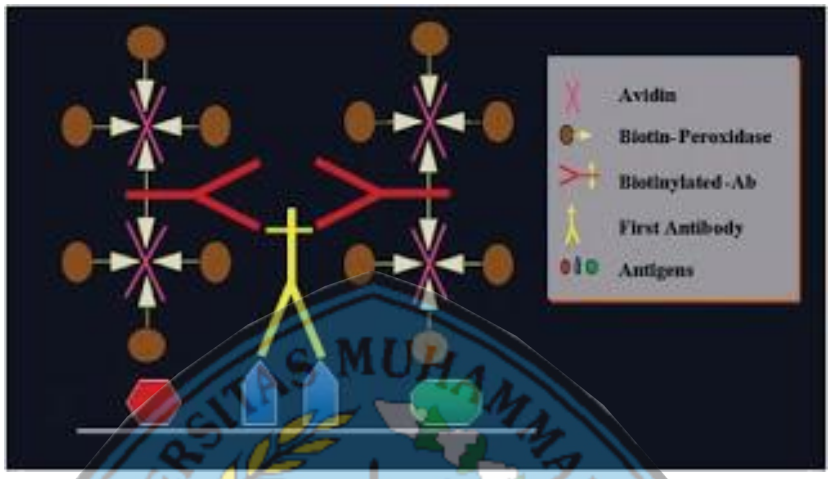


Gambar 5. Gambaran direct labelling (A) dan indirect labelling (B) (Ramos-Vara, 2005)

2.4.3 Metode Avidin-Biotin Complex (ABC)

Metode Avidin Biotin Complex (ABC) menggunakan enzim peroxidase yang berikatan dengan ikatan biotin-avidin. Avidin tersebut akan berikatan dengan biotin pada antibodi sekunder. Peroxidase pada ikatan ABC akan bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama kromogen sehingga menimbulkan visualisasi warna pada sel yang mengandung antigen, dimana proses awal terjadinya antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang berlabel biotin, biotin yang berada pada antibodi sekunder akan diikat oleh ABC yang mengandung peroxidase, dan peroxidase pada rangkaian avidin biotin akan bereaksi dengan substrate H_2O_2 / kromogen (Petersen dan Pedersen, 2016).

repository.unimus.ac.id

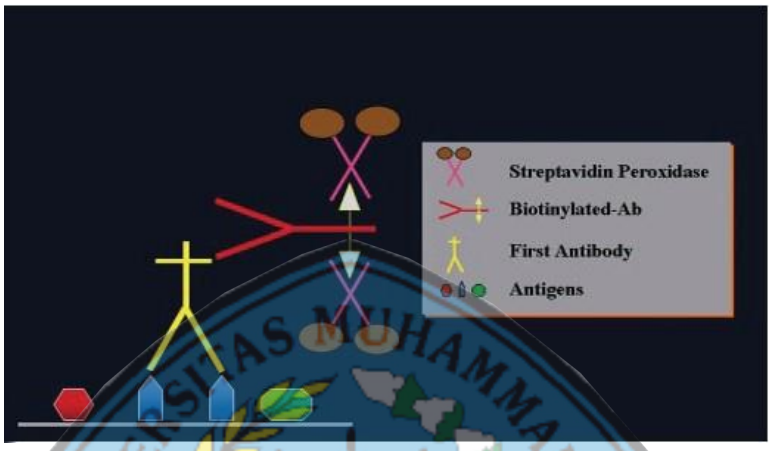


Gambar 6. Gambaran metode Avidin Biotin Complex (ABC) (Ramos-Vara, 2005)

2.4.4 Metode Streptavidin-Peroxidase

Metode streptavidin-peroxidase menggunakan enzim peroxidase yang berikatan langsung dengan streptavidin. Steptavidin yang mengandung peroxidase akan mengenali biotin pada antibodi sekunder. Peroxidase yang pada ikatan streptavidin akan bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama kromogen sehingga menimbulkan visualisasi warna pada sel yang mengandung antigen, diamana proses awal terjadi ketika antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian antibodi sekunder yang berlabel akan berikatan dengan antibodi primer, biotin pada antibodi sekunder diikat oleh streptavidin yang mengandung peroxidase, dan peroxidase akan bereaksi dengan substrate H_2O_2/ kromogen (Petersen dan Pedersen, 2016).

repository.unimus.ac.id

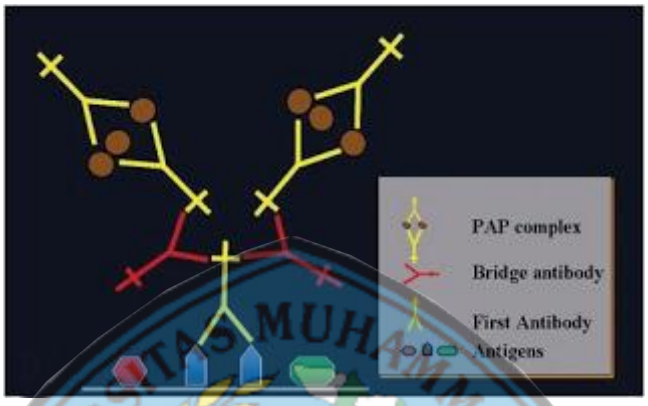


Gambar 7. Gambaran Metode Streptavidin-Peroxidase (Ramos-Vara, 2005)

2.4.5 Metode Peroxidase-antiperoxida (PAP)

Metode peroxidase-antiperoxidase (PAP) menggunakan enzim peroxidase yang berikatan dengan antibodi, dimana antibodi primer dan PAP yang digunakan berasal dari spesies yang sama, misalkan antibodi primer yang digunakan adalah *mouse monoclonal* maka PAP juga harus dalam *mouse*, begitu juga bila antibodi primer spesies *rabbit*, maka antibodi pada PAP juga dalam *rabbit*. Metode ini menggunakan antibodi sekunder yang tidak terkonjugasi (*unconjugated secondary antibody*), dimana spesies antibodi sekunder merupakan anti-antibodi primer yaitu bila antibodi primer adalah *mouse* maka antibodi sekunder adalah anti *mouse*, begitu juga bila antibody primer adalah *rabbit* maka antibodi sekunder adalah anti *rabbit* (Ramos-Vara, 2005).

repository.unimus.ac.id



Gambar 8. Gambaran metode Peroxidase–antiperoxidase (PAP) (Ramos-Vara, 2005)

2.5 Pengertian Gelatin

Gelatin merupakan protein terlarut yang besifat gelling agent (bahan pembuat gel) atau sebagai non gelling agent dan produk alami yang diperoleh dari hidrolisis parsial kolagen (Hastuti et al, 2007). Gelatin merupakan turunan kologen yang berbentuk protein dengan komponen dasar 50,5% karbon, 6,8% hidrogen, 17% nitrogen dan 25,2% oksigen, jika gelatin bereaksi dengan enzim-enzim proteolitik akan mengalami reaksi yang serupa dengan protein (Hidayat, 2015). Pembuatan gelatin dapat diperoleh dari beberapa macam bagian hewan, salah satunya tulang atau kulit sapi.

2.5.1 Komposisi Gelatin

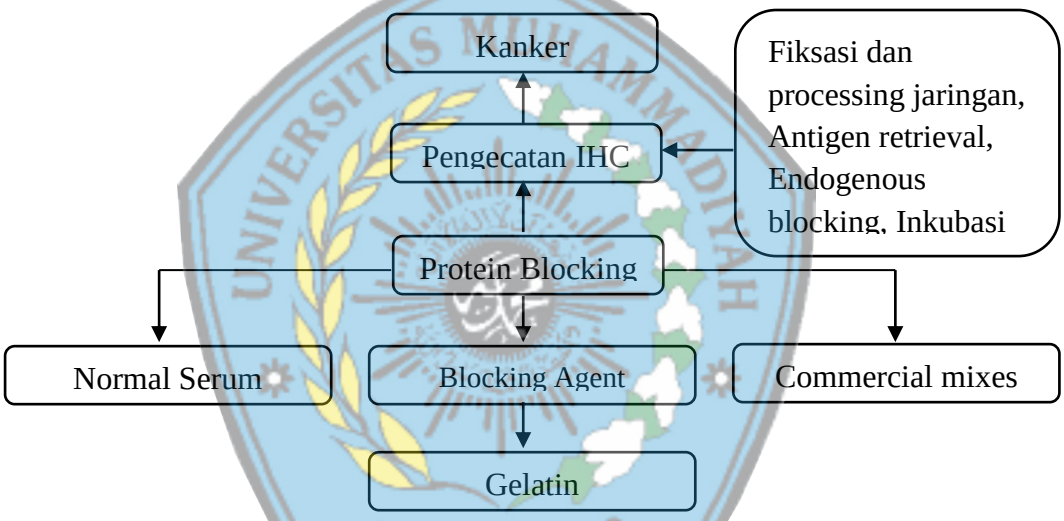
Gelatin mengandung kadar protein yang sangat tinggi. Gelatin mengandung 84-86% protein, kadar lemak hampit tidak ada dan mengandung mineral 2-4%. Gelatin memiliki 9 dari 10 macam asam amino essensial (Hastuti, et al 2007).

repository.unimus.ac.id

2.5.2 Struktur dan Sifat gelatin

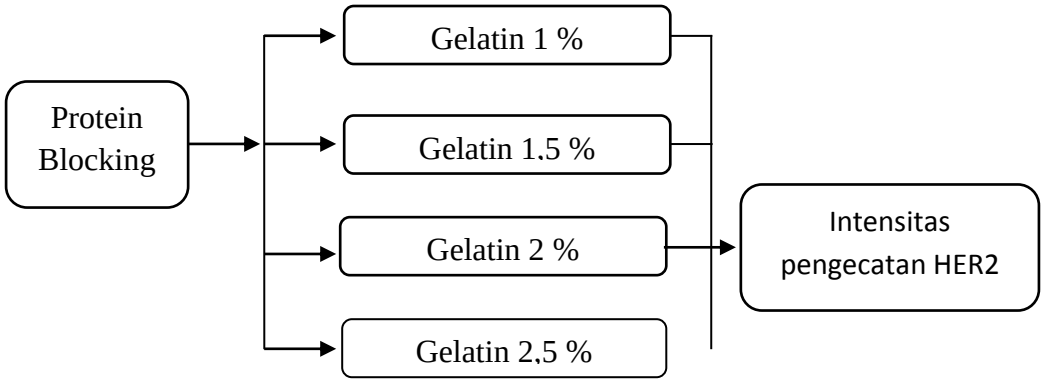
Gelatin memiliki struktur kimia $C_{102}H_{151}N_{31}$, didalamnya terdapat asam amino seperti 14% Hidroxyprolin, 16% Prolin, 26% Glysine, kandungan gelatin juga tergantung dari bahan mentah. Gelatin mempunyai titik isoelektrik 7,0–9,5 , Ph 3,8–6,0, kekuatan gel (g) 75–300, viskositas(mp) 20–75 dan kandungan abu 0,3–2,0% (Agustin, 2013).

2.6 Kerangka Teori



Gambar 9. Kerangka Teori Penelitian

2.7 Kerangka Konsep



repository.unimus.ac.id

Gambar 10. Kerangka Konsep Penelitian

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan gambaran pewarnaan HER2 yang dihasilkan dari pengecatan IHC dengan konsentrasi gelatin 1%, 1,5%, 2% dan 2,5% dengan normal serum. Gelatin dapat menggantikan normal serum.

repository.unimus.ac.id