

## **BAB II** **TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 HER2 pada Kanker**

Kanker dikarakterisasi oleh pertumbuhan yang tidak terkontrol dan akuisisi metastatik. Aktivasi onkogen dan deaktivasi gen tumor supresor mengarah pada progresi siklus sel yang tidak terkontrol dan mekanisme inaktivasi apoptosis. Aktivasi membran metalloprotease membuka jalur fisik metastatic persebaran sel kanker yang semakin lebar. Perubahan genetik yang terjadi yaitu mutasi, translokasi dan delesi kromosom. Perubahan epigenetik merupakan ciri kanker karena mempunyai sifat sebagai sel penyebab kanker dan inisiator karsinogenik (Sarkar et al, 2013).

Proses karsinogenik mempunyai dua prinsip. Prinsip yang pertama adanya kerusakan pada genetik. Kedua yaitu adanya gangguan pada empat kelompok gen yang mengatur regulasi normal yaitu gen yang dapat merangsang pertumbuhan protoonkogen, penghambatan tumor supresor gen, regulasi terhadap apoptosis, dan gen yang terlibat dalam DNA repair (Kumar et al, 2010).

Protoonkogen dapat mempengaruhi pembelahan sel dari berbagai jalur, di mana banyak dari protoonkogen ini akan memproduksi hormon sebagai mediator kimia di antara sel yang akan mendorong terjadinya mitosis. Mutasi dari protoonkogen dapat mengubah ekspresi dan fungsinya serta meningkatkan jumlah dan aktivitas protein yang dihasilkan. Protoonkogen akan berubah menjadi onkogen ketika mengalami mutasi dan hal tersebut akan berpotensi menyebabkan sel untuk membelah secara luas dan tidak terkontrol (Vlahopoulos et al, 2008).

Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 onkogen ERBB2 yang sering disebut sebagai HER2 merupakan suatu protoonkogen yang termasuk dalam golongan *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Gen HER2/neu berlokasi pada kromosom 17q21, mengkode 185 kD glikoprotein transmembran dengan aktifitas tirosin kinase yang berperan dalam proses transduksi sinyal untuk proliferasi dan differensiasi sel kanker (Payne, 2008).

HER2 dianggap sebagai *orphan receptor* karena tidak memiliki ligan spesifik sehingga tidak dapat dikenali dan diaktifkan oleh ligan EGF. Sedangkan, reseptor dari anggota family HER lainnya memiliki ligannya masing-masing. Namun, reseptor HER2 mampu untuk membentuk heterodimer. Heterodimer tersebut merupakan hasil dari kombinasi antara reseptor HER2 dengan berbagai reseptor lainnya dalam family HER, sehingga membentuk kompleks reseptor heterodimer. Oleh karena itu, ligan (EGF) akan mengikat kompleks reseptor heterodimer pada permukaan sel sehingga menyebabkan aktivasi protein intrinsik tirosin kinase. Hasilnya adalah transmisi sinyal *growth factor* akan melewati membran sel menuju bagian intraselluler dari nukleus, sehingga akan mengaktifkan gen HER2 (Wolff, 2013).

Ekspresi gen HER2 meningkat menyebabkan peningkatan proliferasi, metastasis, dan menginduksi angiogenesis dan anti-apoptosis. Aktivasi gen HER2 memerlukan heterodimer dengan reseptor dari family HER lainnya. Namun heterodimer reseptor dari HER2 memiliki perbedaan tingkat stimulasi mitogenik. Kompleks reseptor heterodimer HER2 dengan HER3 merupakan kompleks reseptor yang sering ditemukan pada sel kanker (Gray MJ, Gallick GE, 2010).

Menurut wolff et al (2013) bahwa American Society of Clinical oncology (ASCO) dan College of American Pathologist (CAP) pada tahun 2007 telah merekomendasikan suatu pengujian HER2 untuk mengurangi kesalahan dalam pemeriksaan. Pengujian yang dipakai saat ini ada beberapa metode yaitu imunohistoimia, *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), FISH, *Chromogenic in situ hybridization* (CISH) (Shi et al, 2009). Imunohistokimia digunakan untuk mendeteksi ekspresi protein HER2. Metode imunohistokimia untuk memastikan bahwa imunoreaktivitas pada membran. HER2 terdiri dari grade 0 sampai +3, berdasarkan pada penilaian intensitas reaksi dan persentase sel yang positif, yang dihitung positif hanya reaksi membrane yang komplit pada area yang invasive, sehingga membentuk gambaran yang menyerupai “chicken wire” (Payne, 2008).

## 2.2 Imunohistokimia (IHC)

Imunohistokimia merupakan suatu pemeriksaan untuk mendeteksi keberadaan berbagai macam komponen yang terdapat didalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi ikatan antigen (Ag) dan antibodi (Ab). Teknik imunohistokimia dapat digunakan untuk mempelajari enzim spesifik serta mendeteksi keberadaan berbagai komponen aktif yang terdapat di dalam sel atau jaringan seperti protein dan karbohidrat (Furuya et al, 2004). Reaksi imunohistokimia ini mempunyai sifat yang spesifik, karena bahan yang dideteksi akan direaksikan dengan antibodi spesifik yang dilabel dengan suatu enzim, enzim yang dapat digunakan untuk melabel antibodi yaitu peroksidase. Untuk menandai

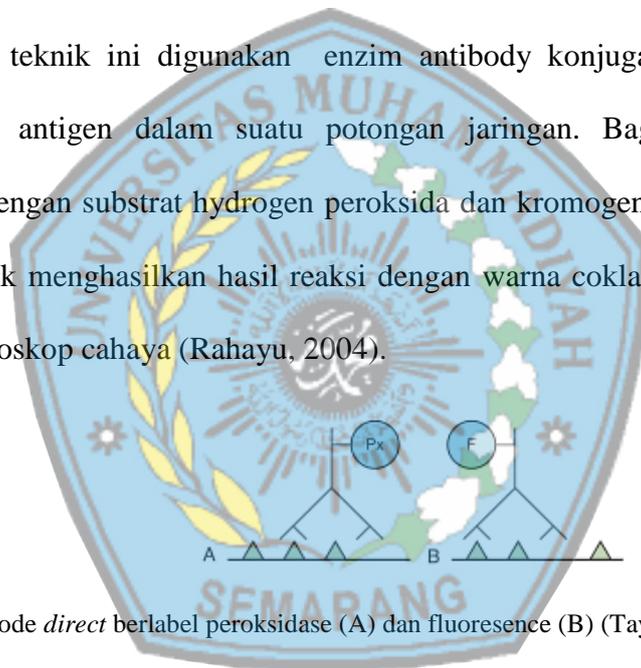
adanya reaksi enzimatik perlu menggunakan suatu indikator warna (chromogen), yang digunakan yaitu DAB (*3,3 diaminobenzidine*) (Widiarti, 2009).

### 2.2.1 Metode Pengecatan IHC

Metode atau sistem deteksi dalam pengecatan IHC yang dapat digunakan untuk melokalisasi dan menampilkan antigen dalam jaringan (Bancroft dan Gamble, 2008) yaitu:

#### 2.2.1.1 Metode langsung (*Direct*)

Pada teknik ini digunakan enzim antibody konjugasi untuk mengikat enzim pada antigen dalam suatu potongan jaringan. Bagian ini kemudian diinkubasi dengan substrat hydrogen peroksida dan kromogen di amino benzidine (DAB), untuk menghasilkan hasil reaksi dengan warna coklat yang dapat dilihat dengan mikroskop cahaya (Rahayu, 2004).



Gambar 1. Metode *direct* berlabel peroksidase (A) dan fluoresence (B) (Taylor dan Cote, 2006)

#### 2.2.1.2 Metode tidak langsung (*Indirect*)

Pengecatan IHC metode *indirect* menggunakan antibody primer yang tidak berlabel. Metode ini terdapat dua lapisan atau lebih dari reagen yang digunakan, di mana lapisan terakhir diberi label. Metode ini lebih rumit dan lama dalam pengerjaan dibandingkan dengan metode *direct*. Kelebihan dari metode ini adalah memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi yaitu beberapa ribu kali lebih sensitive dari pada metode *direct* sehingga metode ini banyak digunakan dalam pemeriksaan pada saat ini ( Howard dan Kaser, 2014).

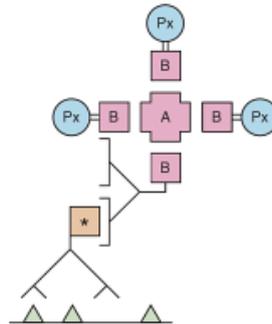
a. Metode *Immunogold Silver Staining* (IGSS)

Tahun 1971, Faulk dan Tayler memperkenalkan metode deteksi antigen dengan menggunakan koloid emas sebagai label. Partikel emas ditingkatkan dengan menambahkan lapisan logam perak untuk menghasilkan partikel logam perak untuk menghasilkan partikel logam perak yang melapisi marker koloid emas sehingga dapat dilihat dalam mikroskop cahaya. Teknik ini tingkat kesensitivitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan teknik (*Peroxidase-Antiperoxidase*) PAP, akan tetapi teknik ini menghasilkan background yang buruk (Bancroft dan Gamble, 2008).

b. (*Strept*)*Avidin-biotin Complex*

Metode ini disebut juga dengan metode *three-step*, karena terdiri dari tiga lapisan. Lapisan pertama yaitu terdiri dari antibodi primer yang tidak berlabel, diikuti dengan *biotinylated* antibodi sekunder (dibuat dari spesies yang berbeda dari antibodi primer). Lapisan ketiga yaitu kompleks *enzym-labeled* biotin dan streptavidin, atau *enzyme-labeled* streptavidin. Baik peroksidase maupun alkali fosfatase dapat digunakan sebagai enzim, dengan diikuti oleh kromogen (Bancroft dan Gamble, 2008).

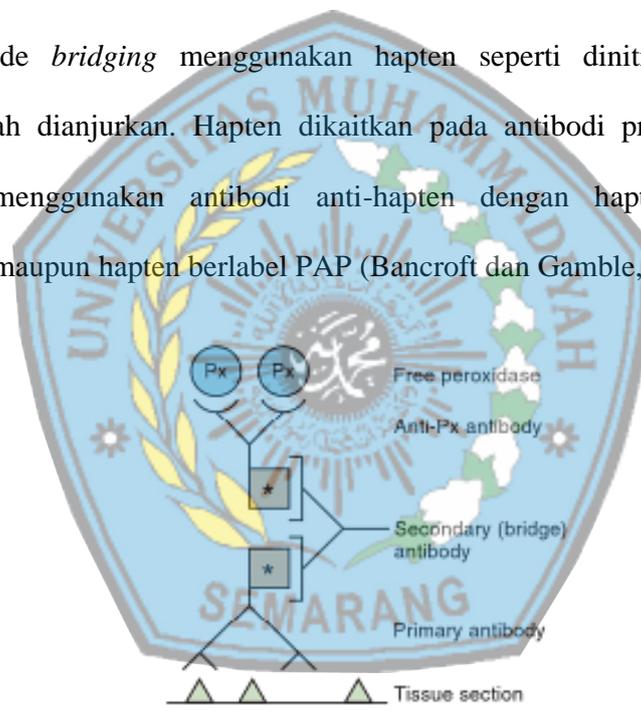
Kekurangan dari penggunaan metode ini adalah tingginya titik isoelektrik dan reagen yang digunakan harus berada dalam kisaran pH netral. Tingginya titik isoelektrik tersebut dapat menghasilkan ikatan non spesifik partikel tertentu yang bermuatan negatif seperti inti sel. Masalah tersebut dapat diatasi dengan penggantian streptavidin menjadi avidin (Bancroft dan Gamble, 2008).



Gambar 2. Metode Strep (avidin) biotin complex (Taylor dan Cote, 2006)

### c. Metode Pelabelan Hapten

Metode *bridging* menggunakan hapten seperti dinitrophenol dan asam arsanilik telah dianjurkan. Hapten dikaitkan pada antibodi primer dan kompleks diciptakan menggunakan antibodi anti-hapten dengan hapten berlabel enzim peroksidase maupun hapten berlabel PAP (Bancroft dan Gamble, 2008).

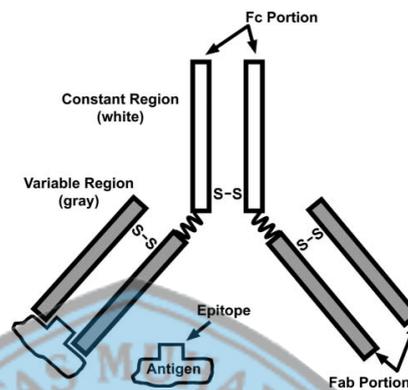


Gambar 3. Metode pelabelan hapten (Taylor dan Cote, 2006)

## 2.3 Inkubasi Antibodi

Antibodi merupakan protein peptida yang dikode oleh gen-gen spesifik, menghasilkan sistem imun sebagai respon terhadap keberadaan antigen yang dapat melindungi tubuh terhadap infeksi mikroorganismenya. Antibodi terdiri dari dua fragmen Fab (*antigen-binding fragment*) dengan fragmen Fc (*constant fragment*). Antibodi tersusun atas 4 rantai polipeptida yaitu dua rantai berat (*heavy*

*chain*) identik dan dua rantai ringan (*light chain*) identik yang saling berhubungan dengan ikatan disulfide yang akan membentuk molekul berbentuk Y yang mempunyai area hinge (engsel) fleksibel (Palangka, 2014).



Gambar 4. Struktur molekul antibodi (Burry, 2011)

Antibodi yang berada pada rantai berat dan ringan terletak dibagian ujung lengan Y membentuk dua sisi pengikat (*bivalent*) antigen dimana berperan dalam spesifitas suatu antibodi terhadap antigen tertentu. Daerah konstan berperan dalam pembagian kelas antibodi dimana lengan Y dan batang molekul selalu identik pada semua antibodi dari kelas yang sama. Salah satu kelas antibodi yaitu molekul IgG yang berfungsi sebagai pelindung terhadap mikroorganisme dan toksin yang bersirkulasi, mengaktifasi sistem komplemen, dan mengikatkan keefektifan sel fagosit (Sloane, 2003).

Antibodi yang dapat digunakan untuk inkubasi dapat menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal. Antibodi monoklonal merupakan antibodi yang dihasilkan oleh klon dari sel tunggal hasil fusi sel limfosit B dengan sel myeloma yang memiliki homogenitas, *affinitas* dan spesifitas tinggi (Rittenburg, 1990). Perbandingan sifat antara keduanya ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbedaan sifat antibody polikloal dan monoklonal

| Karakteristik              | Antibodi monoclonal      | Antibodi poliklonal  |
|----------------------------|--------------------------|--|
| Jumlah                     | Tidak terbatas           | Terbatas dan bervariasi  |
| Homogenitas                | Homogen                  | Campuran antibodi  |
| Afinitas                   | Tinggi                   | Tinggi   |
| Spesifitas                 | Tinggi                   | Rendah   |
| Kebutuhan Antigen (epitop) | Antigen murni (1 epitop) | Dibutuhkan antigen tidak murni untuk memproduksi antisera spesifik |

Sumber: Post Harvest Teknologi Institute (1999)

Inkubasi merupakan masa atau waktu yang dibutuhkan antibodi untuk membentuk ikatan spesifik dengan antigen. Waktu inkubasi mempengaruhi setiap langkah dalam protokol imunohistokimia. Visualisasi waktu inkubasi menunjukkan ekspresi kolorimetri secara langsung (Taylor et al 2013).

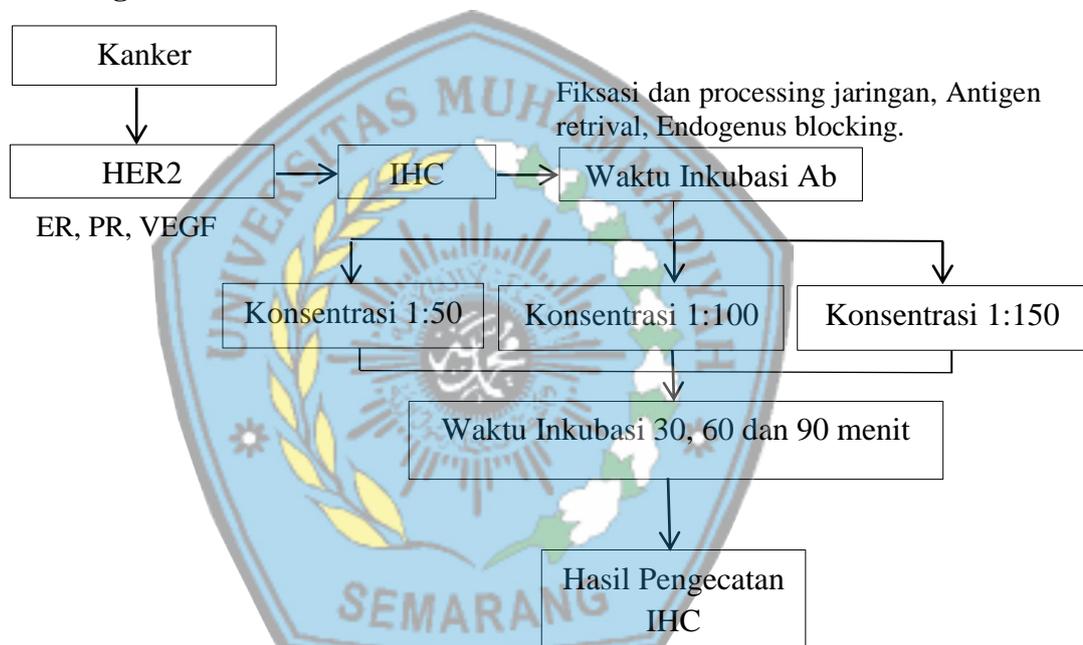
Titer antibodi mempunyai hubungan terbalik dengan waktu inkubasi. Titer antibodi yang semakin tinggi, membutuhkan waktu inkubasi yang pendek untuk hasil yang optimal. Konsentrasi yang lebih tinggi dari antibodi spesifik (afinitas yang lebih tinggi) memungkinkan untuk memperpendek waktu inkubasi (Boenisch, 2001).

Lama inkubasi pada suhu ruang untuk sebagian besar antibodi primer antara 20-30 menit. Bila temperature melebihi 37°C dapat mengurangi waktu inkubasi dan juga didapatkan hasil false negatif atau false positif. Inkubasi *overnight* antibodi primer pada 4°C memerlukan konsentrasi rendah, untuk meminimalkan *background staining*. Proses pengeringan (*drying*) antara waktu inkubasi dan pencucian dapat menghasilkan false negatif. Inkubasi dapat dilakukan dalam humidified chamber (Rahayu, 2004).

Waktu inkubasi yang pendek akan menunjukkan hasil pewarnaan parsial atau intensitas yang lemah, sementara waktu inkubasi yang lebih lama dapat meningkatkan intensitas pewarnaan. Waktu yang optimum selama waktu inkubasi

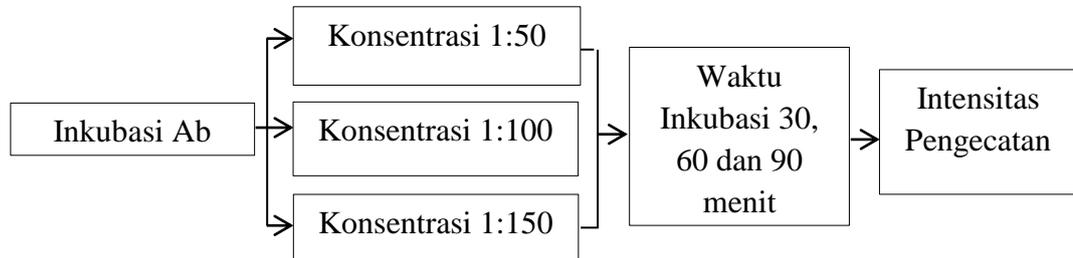
yaitu kurang dari 20 menit untuk hasil yang spesifik. Titer Antibodi yang rendah harus diinkubasi dengan waktu yang lama untuk mencapai keseimbangan (Boenisch, 2001). Reaksi inkubasi harus memberikan intensitas pewarnaan yang cukup untuk mengidentifikasi ekspresi HER2 pada pengecatan imunohistokimia (Taylor et al, 2013). Inkubasi berdasarkan starr trek HRP detection kit-biocare inkubasi yang digunakan yaitu dengan lama waktu 1 jam pada suhu ruang (25°C).

#### 2.4 Kerangka Teori



Gambar 5. Kerangka Teori Penelitian

## 2.5 Kerangka Konsep



Gambar 6. Kerangka Konsep Penelitian

## 2.6 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini yaitu variasi waktu inkubasi antibodi tidak terdapat perbedaan hasil pengecatan imunohistokimia konsentrasi 1:50, 1:100 dan 1:150 variasi waktu 30, 60 dan 90 menit dengan waktu inkubasi 24 jam.

