

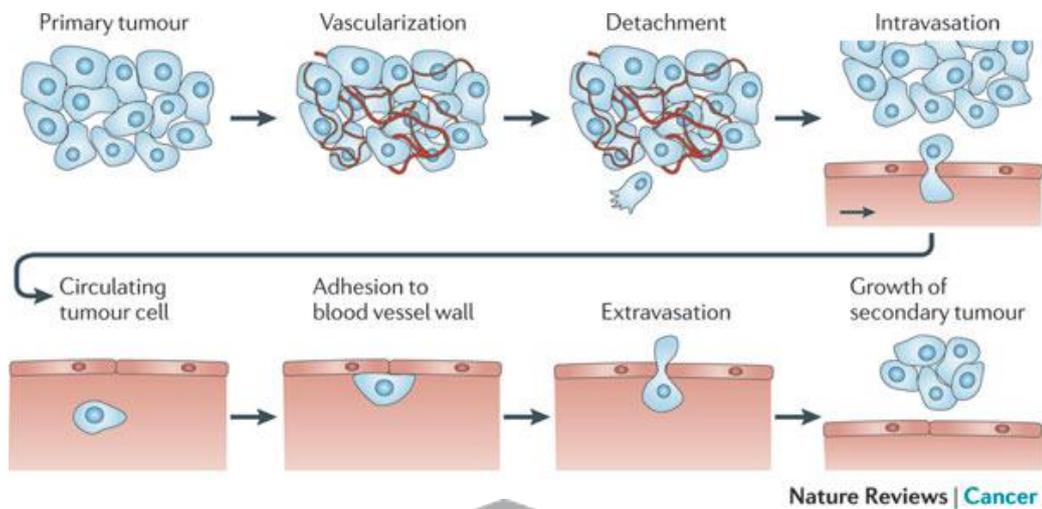
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Karsinogenesis

Karsinogenesis merupakan suatu proses pembentukan sel kanker yang patogenesisnya secara molekuler merupakan penyakit genetik. Proses ini terjadi disebabkan oleh berbagai faktor (*multifaktorial*) yang menyerang tubuh secara bertahap (*multistage*). Bahan-bahan yang dapat menyebabkan sel kanker disebut sebagai karsinogen. Berdasarkan asalnya karsinogen dapat berasal dari faktor eksogen seperti karsinogen, kimiawi, virus, dan fisik, dan faktor endogen seperti hormon sex. Adapula yang mengatakan bahwa diet, umur, keturunan, rangsang menahun dan trauma sebagai pencetus terbentuknya kanker (Yusni et al. 2008).

Proses karsinogenesis sangat kompleks, yang melibatkan banyak gen didalamnya. Pada perjalanannya, satu sel kanker harus melepaskan diri dari kelompoknya (*primary tumor*) untuk kemudian mengadakan invasi ke daerah sekitarnya, berusaha menembus pembuluh limfe dan pembuluh darah, berjuang melawan sistem imun tubuh (*host immune defense*), berhenti diorgan tujuannya kemudian mulai berkembang biak di lingkungan barunya (*secondary tumor*) (Faried 2015).



Gambar 1. Proses pembentukan sel kanker (Wirtz et al. 2011).

Karsinogenesis sejak lama diduga disebabkan oleh akumulasi perubahan genetik dan epigenetik yang menyebabkan perubahan pengaturan normal kontrol molekuler perkembangan biakan sel. Perubahan genetik tersebut dapat berupa aktivasi protoonkogen dan atau inaktivasi gen penekan tumor yang dapat memicu pembentukan sel kanker dan memperbesar progresinya (Syaifudin 2010). Pada dasarnya karsinogenesis disebabkan oleh adanya perubahan basa DNA dalam sel target yang biasa disebut mutasi (Susilowati 2010).

## 2.2 HER2

Human epidermal growth factor receptor-2 onkogen ERBB2 (lebih sering disebut sebagai HER2) mengkode *epidermal growth factor receptor* (EGFR) famili dari tyrosine kinase, memiliki perananan penting dalam diferensiasi, adhesi, dan motilitas sel (Widjaja 2004).

Overekspresi dari HER2 meningkatkan dan memperpanjang sinyal yang memicu transformasi sel mengakibatkan terjadinya karsinogenesis. Amplifikasi

dan overekspresi HER2 telah dilaporkan terjadi pada beberapa kasus keganasan seperti kanker payudara, ovarium, prostat, kolorektal, pankreas, dan lambung (Marchini et al. 2013).

*American Society of Clinical Oncology (ASCO)* dan *College of American Pathologist (CAP)* pada tahun 2007 merekomendasikan suatu pengujian HER2 untuk meningkatkan ketepatan dan mengurangi kesalahan dalam pemeriksaan (Wolff et al. 2007). Ekspresi HER2 dapat dideteksi dengan beberapa metode yaitu immunohistochemistry (IHC), fluorescence in situ hybridization (FISH), chromogenic in situ hybridization (CISH), dan silver enhanced in situ hybridization (SISH) (Gutierrez & Schiff 2011).

### 2.3 IHC

IHC adalah teknik penggunaan antibodi spesifik untuk mengenali protein (antigen) yang dihasilkan oleh sel atau jaringan tertentu, merupakan teknik yang penting dalam diagnosis patologi. Dalam mendeteksi antigen, IHC memberikan gambaran lebih obyektif, karena teknik ini menggunakan pewarnaan yang dapat diamati langsung dengan mikroskop cahaya. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan penggunaan teknik ini adalah sumber jaringan yang digunakan, adanya antigen dalam jaringan, afinitas ikatan antara antigen dan antibodi, dan metode yang digunakan dalam meningkatkan ekspresi antigen (Surjadi et al. 2006).

### 2.3.1 Tahapan Dasar IHC

Prosedur umum pengecatan IHC terdiri dari beberapa langkah atau tahapan dasar yaitu :

#### 2.3.1.1 Deparafinasi dan Rehidrasi

Deparafinasi adalah proses untuk menghilangkan parafin dari jaringan. Hal ini penting karena parafin dapat menutupi antigen dan mencegah terjadinya reaksi dengan antibodi (Prabin et al. 2009).

Pada prosedur IHC konvensional proses deparafinasi umumnya digunakan *xylol*. Proses pengolahan dan pengecatan histologi tanpa *xylol* (*histology without xylene*) telah diperkenalkan yaitu dengan menggunakan sabun cuci piring (*dishwashing soap*) sebagai *deparaffinization agent* dan memberikan hasil yang setara dengan prosedur IHC konvensional. Teknik ini lebih aman sekaligus jauh lebih murah daripada prosedur IHC konvensional dengan menggunakan *xylol* (Buesa & Peshkov 2009).

Rehidrasi merupakan proses memasukan air ke dalam preparat jaringan pada gelas objek setelah proses deparafinasi. Jaringan pada gelas objek yang sebelumnya telah melalui proses deparafinasi kemudian direndam dalam alkohol bertingkat dari konsentrasi tinggi menuju konsentrasi rendah setelah itu, preparat jaringan direndam ke dalam akuades selama dua menit (Ningsih 2011).

#### 2.3.1.2 Endogenous Peroxidase Blocking

Proses *endogenous peroxidase blocking* adalah tahap penting dalam IHC. Aktifitas *endogenous enzymatic* ditemukan dalam jaringan dan dapat bereaksi dengan antibodi menyebabkan *non spesific background staining*. Salah

satu aktifitas enzim tersebut adalah *endogenous peroxidase*. Aktifitas *endogenous peroxidase* ini dapat dihilangkan dengan merendam jaringan dalam larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) sebelum proses inkubasi antibodi primer (Prabin et al. 2009).

### 2.3.1.3 Antigen Retrieval

Deparafinasi mampu menghilangkan parafin dari jaringan, namun antigen masih tertutup (*masking*) reaksi *cross link formation* oleh parafin dan formalin. Antigen dapat dibuka (*unmasking*) dengan metode antigen retrieval. Salah satu yang umum digunakan adalah *Heat Induced Epitope Retrieval* (HIER). Antigen Retrieval metode HIER dilakukan dengan pemanasan dalam *Citrate Buffer Solution* (Prabin et al. 2009).

### 2.3.1.4 Protein Blocking

Penyebab utama terjadinya *background staining* pada IHC adalah interaksi *hydrophobic* dan *ionic* serta aktifitas *endogenous enzyme*, ikatan *hydrophobic* dapat diminimalisir dengan proses protein blocking (Kabiraj et al. 2015). Protein blocking dapat dilakukan menggunakan normal serum, atau larutan blocking seperti bovine serum albumin (BSA), gelatin, *tryptone casein peptone*, *non-fat dry milk* dan casein (Buchwalow et al. 2011).

### 2.3.1.5 Inkubasi Antibodi Primer

Inkubasi diperlukan dalam IHC salah satunya pada proses inkubasi antibodi primer. kondisi inkubasi antibodi dipengaruhi oleh afinitas, suhu, karakteristik jaringan, dan prosedur. Prosedur yang umum digunakan adalah 30 sampai 90 menit pada suhu ruang, waktu inkubasi dapat dipercepat bila inkubasi

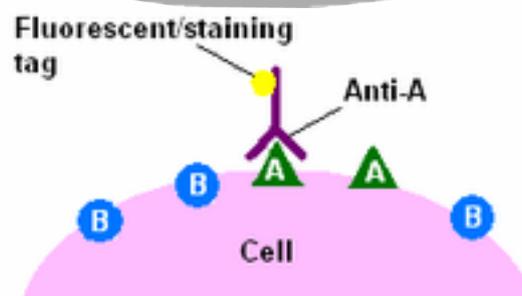
dilakukan pada suhu 37°C hingga 40°C, atau diperlama (semalaman) bila inkubasi dilakukan pada suhu 4°C. Untuk mencegah evaporasi dari larutan antibodi, inkubasi harus dilakukan pada kondisi lembab (Ramos-Vara & Miller 2014).

### 2.3.2 Metode Pengecatan IHC

Metode dalam teknik pengecatan IHC yang dapat digunakan untuk mendeteksi ekspresi antigen dalam jaringan (Mashhood 2008) yaitu:

#### 2.3.2.1 Metode Langsung (Direct methods)

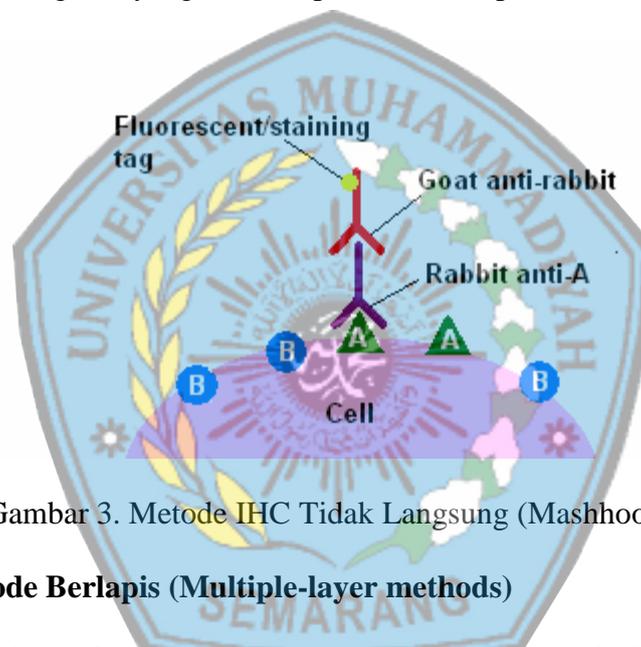
IHC dengan metode langsung merupakan pengecatan satu langkah (*one-step staining method*) yang melibatkan antibodi berlabel bereaksi langsung dengan antigen pada jaringan. Metode ini hanya menggunakan satu antibodi jadi prosedurnya lebih mudah dan cepat, namun tidak sensitif untuk mendeteksi antigen karena sangat sedikit penguatan sinyal yang terjadi pada prosedur ini oleh sebab itu lebih jarang digunakan daripada metode tidak langsung (Mashhood 2008).



Gambar 2. Metode IHC langsung (Mashhood 2008).

### 2.3.2.2 Metode Tidak Langsung (Indirect methods)

IHC dengan metode tidak langsung merupakan pengecatan yang melibatkan antibodi primer yang tidak berlabel pada lapisan pertama (*first layer*) bereaksi dengan antigen pada jaringan kemudian antibodi sekunder berlabel pada lapisan kedua (*second layer*) ditambahkan dan bereaksi dengan antibodi primer. Metode ini lebih sensitif karena penguatan sinyal melalui reaksi antibodi sekunder dengan situs antigenik yang berbeda pada antibodi primer (Mashhood 2008).



Gambar 3. Metode IHC Tidak Langsung (Mashhood 2008).

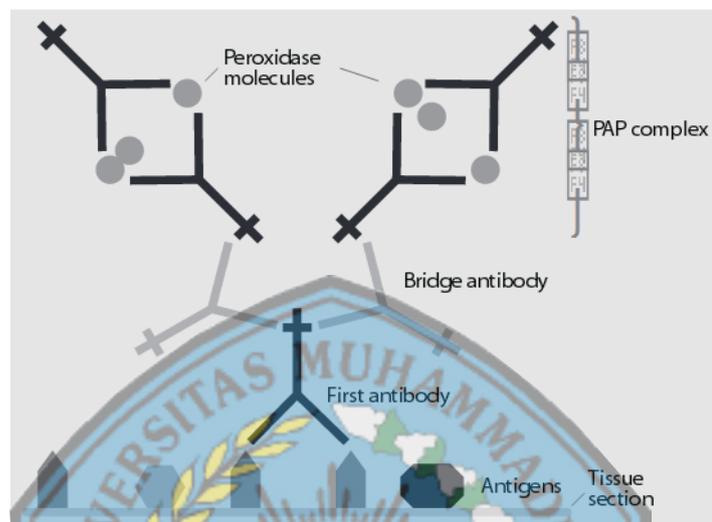
### 2.3.2.3 Metode Berlapis (Multiple-layer methods)

Metode IHC yang termasuk dalam metode berlapis antara lain yaitu metode peroxidase-antiperoxidase (PAP) dan metode avidin-biotin complex (ABC), keduanya merupakan metode yang umum digunakan pada laboratorium (Ramos-Vara et al. 1999).

#### 2.3.2.3.1 Metode Peroxidase-AntiPeroxidase (PAP)

Pada metode PAP antibodi pada dua lapisan pertama mirip dengan metode tidak langsung tetapi tidak berlabel, kemudian antibodi pada lapisan ketiga berikatan dengan molekul peroksidase (PAP complex), lapisan antibodi kedua

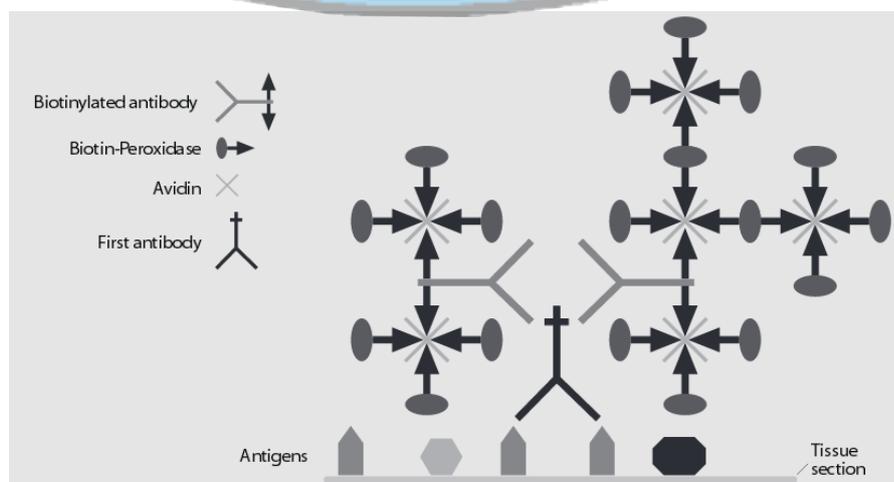
bertugas sebagai jembatan antara antibodi lapisan pertama dan kedua. Metode ini 100-1000 kali lebih sensitif dibandingkan metode tidak langsung (Ramos-Vara et al. 1999).



Gambar 4. Metode IHC Peroxidase-Antiperoxidase (Ramos-Vara et al. 1999).

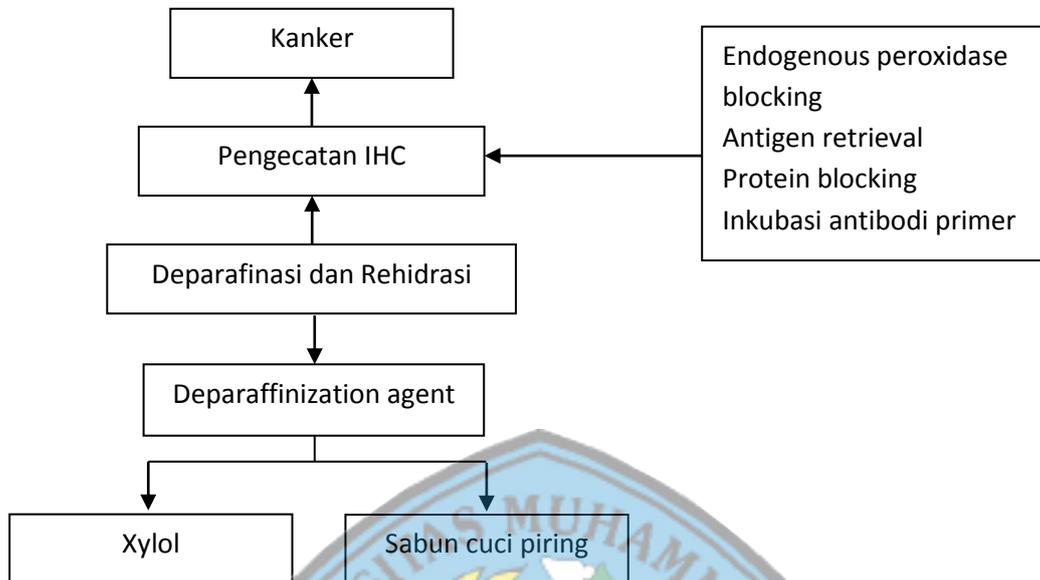
### 2.3.2.3.2 Metode Avidin-Biotin Complex (ABC)

Pada metode ABC antibodi kedua terbiotinilasi dan antibodi lapisan ketiga merupakan kompleks avidin dicampur dengan biotin yang dilabel dengan penanda tertentu seperti enzim dan fluorochrome (Ramos-Vara et al. 1999).



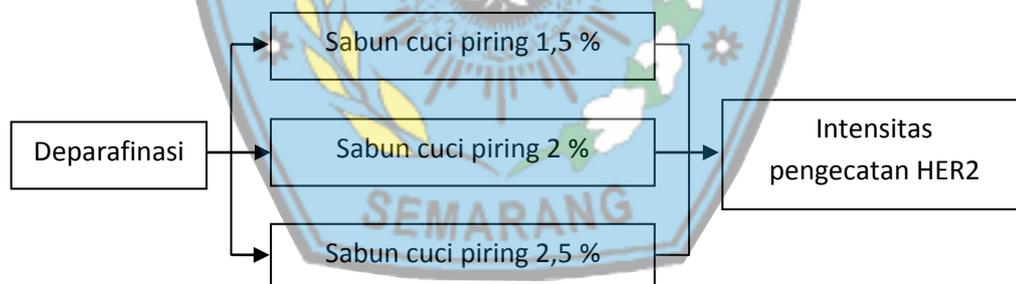
Gambar 5. Metode IHC Avidin-Biotin Complex (Ramos-Vara et al. 1999).

## 2.4 Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka teori penelitian

## 2.5 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka konsep penelitian

## 2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan intensitas HER2 yang dihasilkan dari pengecatan IHC baik menggunakan *xylo* maupun sabun cuci piring.