

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinogenesis

Menurut National Cancer Institute (2016) karsinogenesis adalah proses dimana normal sel bertransformasi menjadi sel kanker. Penelitian kanker telah mengungkapkan bahwa model klasik karsinogenesis ada tiga langkah proses yang terdiri dari inisiasi, promosi, dan progresi. Perluasan model karsinogenesis ke dalam proses multi-mekanistik yang terjadi selama periode waktu yang lama telah didukung oleh penelitian eksperimental mengenai sel puncak kanker, komunikasi interkomsel gap junction dan teknik kultur 3D. Sebelum pengumpulan data karsinogenisitas dan genotoksisitas ditambah dengan penelitian saat ini memberikan dasar untuk memahami proses karsinogenik yang rumit yang ditandai oleh aspek mutagenik dan epigenetik.

Konsep multi-tahap dari karsinogenesis pertama kali diusulkan oleh Berenblum dan Schubik pada tahun 1948 dan didukung oleh beberapa penelitian selanjutnya yang mengenali tiga fase utama dari karsinogenesis yaitu : inisiasi, promosi dan progresi (Weiss, 2004) yaitu :

a. Inisiasi

Inisiasi neoplasia pada dasarnya merupakan perubahan ireversibel pada sel somatik target yang sesuai. Dalam istilah yang paling sederhana, inisiasi melibatkan perubahan pada satu sel stabil yang timbul secara spontan atau diinduksi oleh paparan karsinogen. Langkah ini dianggap sebagai langkah awal dari karsinogenesis, dimana sel genom mengalami mutasi, menciptakan potensi untuk pengembangan neoplastik, yang merupakan predisposisi sel yang terkena dan menurunkan transformasi kepada neoplastik berikutnya. DNA manusia yang bertanggung jawab terhadap transformasi disebut onkogen. Banyak dari onkogen aktif telah diisolasi dengan kloning molekuler, misalnya

pada karsinoma kandung kemih, limfoma Burkitt, karsinoma paru-paru, karsinoma payudara dan beberapa karsinoma lainnya (Buckle et al, 2013),.

Ekspresi penuh dari neoplastik dalam mengawali mutasi selalu membutuhkan interaksi dengan mutasi gen hasil mutasi lainnya yang kemudian timbul di lingkungan selular dan mutasi awal menciptakan potensi stabil pada perkembangan pra-neoplastik pada sel dengan kapasitas proliferaatif. Sel yang mengalami transformasi mengalami pemecahan terus menerus pada kariotipe yang ditransformasikan dengan mutasi lebih lanjut, sebelumnya bentuk yang ganas dimanifestasikan. Setiap onkogen berhubungan erat dengan urutan DNA normal dalam genom seluler, proto-onkogen (UNSCEAR 2000)..

b. Promosi

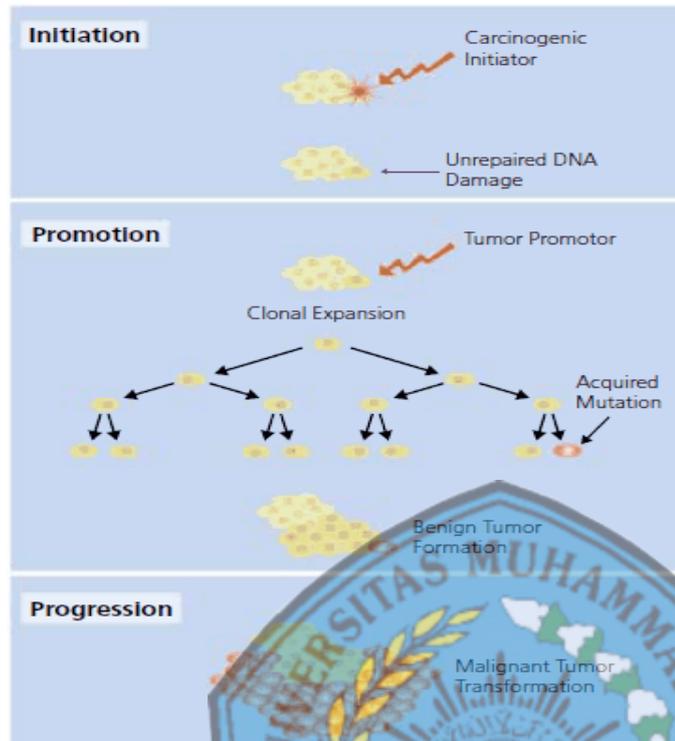
Sel yang bertransformasi bisa tetap tidak berbahaya, kecuali hingga mereka dirangsang untuk mengalami proliferasi lebih lanjut yang mengganggu keseimbangan selular. Perubahan selanjutnya dari sel inisiasi yang mengarah ke transformasi neoplastik mungkin lebih banyak melibatkan lebih dari satu langkah yang membutuhkan perulangan dan ekspose yang berkepanjangan untuk mempromosikan rangsangan (Hathway, 2013).

Perkembangan neoplastik sangat dipengaruhi oleh lingkungan intraselular dan ekstraselular yang mungkin dapat menghasilkan peningkatan potensi pertumbuhan seluler dari proses komunikasi intercellular yang membatasi otonomi seluler dan dengan demikian mengkoordinasikan pemeliharaan jaringan dan pengembangan sel (UNSCEAR, 2000).

c. Progresi

Progresi adalah proses di mana perubahan neoplasma berturut-turut semakin meningkatkan dan sub populasi ganas. Mekanisme perkembangan molekuler tumor tidak sepenuhnya dipahami, tapi mutasi dan penyimpangan eksposur berulang pada rangsangan karsinogenik atau oleh tekanan seleksi yang memilih klonal derivatif otonom. Sel yang diinisiasi berkembang biak menyebabkan kenaikan secara cepat pada ukuran tumor. Seiring

pertumbuhan ukuran tumor, sel bisa mengalami mutasi lebih lanjut, mengarah pada meningkatkan heterogenitas populasi sel (Hathway, 2013).



Gambar 1. Fase Karsinogenesis

Kerusakan DNA seluler terlibat dalam mutagenesis dan perkembangan kanker. DNA dalam sel manusia mengalami kerusakan hingga beberapa ribu hingga satu juta setiap harinya yang dihasilkan oleh proses eksternal (eksogen) dan internal metabolik (endogen). Perubahan pada genom seluler dapat menghasilkan kesalahan dalam transkripsi DNA dan selanjutnya diterjemahkan ke dalam protein yang diperlukan untuk pemberian sinyal dan fungsi seluler (Chatterjee dan Walker, 2017).

2.2 Immunohistokimia

Immunohistoimia atau IHC adalah proses untuk menetapkan lokasi dan jenis protein (antigen) tersebut di dalam sel-sel jaringan (Hastuti dan Lubis, 2011). Immunohistokimia seringkali digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi

biomarker ataupun protein yang tereksresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Ramos-vara, 2005)

2.3 Protein Blocking (Pemblokiran protein)

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 (Masruro,2016)

b. Protein solution

Dalam metode ini buffer protein yang terkonsentrasi digunakan untuk menyaingi (menghalangi) antibodi agar tidak mengikat epitop nonspesifik dalam sampel. Idenya adalah antibodi tidak akan mengikat epitop nonspesifik lebih baik daripada pesaing protein nonspesifik ini. Dengan demikian konsentrasi tinggi dari pesaing protein ini bisa keluar-bersaing dengan antibodi dan menurunkan gangguan. Metode ini sering kali paling irit dan sering bekerja dengan baik untuk antibodi monoklonal. Penyangga pemblokiran protein yang umum adalah: 0,1 sampai 0,5% bovine serum albumin (BSA), gelatin atau susu kering tanpa lemak (Molodenski, dkk, 2016).

c. Commercial Mixes

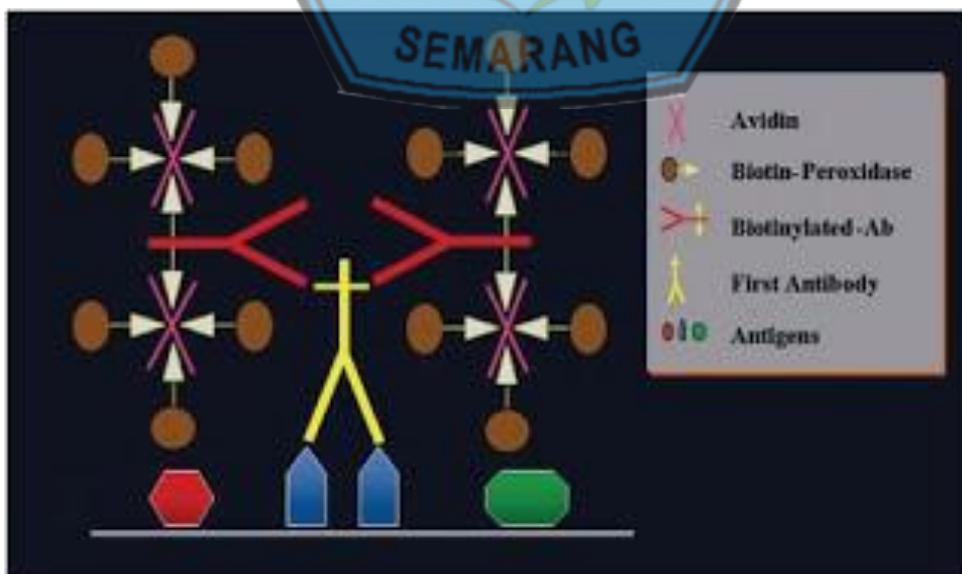
Ada berbagai ragam *comercial mixes* pemblokir komersial di pasaran. Penyangga ini biasanya terbuat dari protein tunggal yang terkonsentrasi, atau senyawa bebas protein (Radig,2013). Blocking agen tersebut biasanya terbuat dari protein tunggal atau protein bebas (Masruro,2016)

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 Avidin-Biotin Complex (ABC)

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, dimana 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).



Gambar 2.

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

2.4.2 Tahap Dasar IHC

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

2.4.2.1 Fiksasi dan *Processing* jaringan

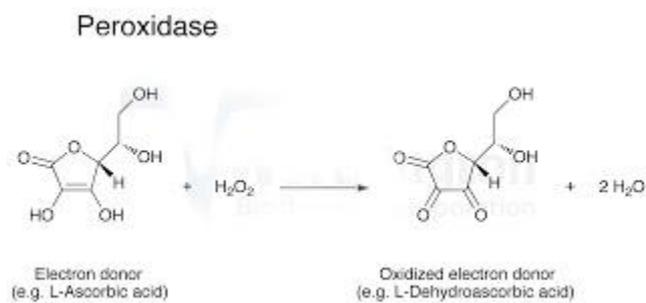
Fiksasi merupakan sebab penting lain dari variasi dalam reproduktifitas IHC. Spesimen bedah diperbaiki pada formalin buffering 10% netral (NBF). Proses ini mencegah autolisis dan mempertahankan morfologi jaringan dan seluler. Untuk kebanyakan jaringan, fiksasi selama 24 jam pada suhu kamar dianjurkan. Fiksasi juga diperlukan pada bagian beku pada situasi tertentu seperti mengevaluasi antibodi baru. Dalam kasus tersebut, bagian beku tetap aseton atau NBF dapat digunakan (Kim et al, 2016).

2.4.2.2 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). Beberapa larutan yang digunakan dalam proses antigen retrieval adalah sodium Citrat, EDTA, Tris, Urea, Sukrosa, dan larutan komersial yang disediakan oleh kit (platero, 2009).

2.4.1.3 Endogenous *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 H₂O₂ yang diberikan bersama DAB menimbulkan warna coklat pada sel yang mengandung *endogenous peroxidase* (Irawan, 2015).



Gambar 3. Reaksi *Peroxidase* terhadap H₂O₂ (Irawan, 2015)

2.5 Estrogen-Receptor (ER)

Hormon reseptor adalah protein yang ditemukan di dalam dan di sel payudara yang mengambil sinyal hormon yang memberitahu sel untuk tumbuh. Kanker disebut estrogen-receptor-positive (ER +) jika memiliki reseptor estrogen. Hal ini menunjukkan bahwa sel kanker, seperti sel payudara normal akan menerima sinyal dari estrogen yang bisa mendorong pertumbuhan sel (Kinsella et.al 2012).

Estrogen Receptor adalah keluarga reseptor nuklir faktor transkripsi ligand-activated yaitu bertanggung jawab atas tindakan fisiologis estrogen. Reseptor ini terbagi menjadi 2 subtype, estrogen reseptor α (ER- α) dan reseptor estrogen β (ER- β). Subtype tersebut berada di organ yang berbeda dalam tubuh manusia. ER- α sebagian besar diekspresikan jaringan reproduksi, ginjal, tulang, adiposa putih jaringan, dan hati. Sedangkan ER- β dinyatakan dalam ovarium, prostat, paru-paru, saluran gastrointestinal, kandung kemih, sel hematopoietik, dan pusat sistem saraf (SSP) (Matthews,2003).

2.6 Hasil Pengecatan ER

Hasil pengecatan ER+ akan berwarna coklat pada inti sel karena terdapat substrat DAB (Diaminobenzidine). Pembacaan hasil ER pada mikroskop perbesaran 400x sebanyak 100 sel. Intensitas yang didapat selanjutnya dicocokkan dengan AJCP (*American Journal Of Clinical Pathologi*) 2013. Sehingga menghasilkan suatu data. Data yang didapatkan selanjutnya dikumpulkan dan dicatat (Shi et al, 2016).

2.7 Susu Kedelai

Kedelai (*Glycine max*) telah dikenal sebagai kacang emas (Bansal and Parle, 2010). Menurut Rahmat Rukmana dalam Budimarwanti (2010), kandungan gizi dalam tiap 100 gram biji kedelai kering adalah sebagai berikut:

Tabel 2.3Kandungan Nutrisi Kedelai

Kandungan Gizi	Proporsi nutrisi dalam biji
Kalori (kal)	268,00
Protein (gram)	30,90
Lemak (gram)	15,10
Karbohidrat (gram)	30,10
Kalsium (mgram)	196,00
Fosfor (mgram)	506,00
Zat besi (mgram)	6,90
Vitamin A (SI)	95,00
Vitamin B1 (mgram)	0,93
Vitamin C (mgram)	0,00
Air (gram)	20,00
Bagian yang dapat dimakan (%)	100,00

Sumber : Rahmat Rukmana dalam Budimarwanti (2010)

Protein dalam kedelai memiliki senyawa isoflavon. Efek antioksidan yang dimiliki isoflavon pada susu kedelai memiliki keuntungan untuk menurunkan risiko terjadinya penyakit kronis. Susu kedelai memiliki efek anti oksidan dan pelindung hati yang dapat membantu menurunkan stress oksidatif dan kerusakan yang terjadi didalam tubuh. Kerusakan sel sebagai hasil stress oksidatif dipercaya merupakan penyebab utama dari penyakit kardiovaskular melalui oksidasi LDL dan kanker melalui DNA (Koswara, 2006).

Hasil pengujian menemukan bahwa isoflavon adalah fitoestrogen paling banyak di kedelai dan secara struktural mirip dengan 17 beta-estradiol (Bu dan Lephart, 2007). Genistein sebagai isoflavon alami kedelai adalah merupakan aflavonoid dalam kacang-kacangan dan beberapa obat-obatan herbal. Ini memiliki banyak efek bagi kesehatan dan asupannya dianggap aman dan tidak beracun setelah pemberian farmakologis pada manusia (Bloedon,2002).

Kemampuan lain dari isoflavon adalah dapat menutupi atau memblokir efek potensial yang merugikan akibat produksi estrogen yang berlebihan dalam tubuh. Isoflavon dapat berfungsi sebagai estrogen selektif dalam pengobatan, menghasilkan efek menguntungkan (sebagai anti kanker dan menghambat atherosklerosis) tetapi tidak menimbulkan resiko (meningkatkan resiko kanker payudara dan endometrial) yang biasa dihubungkan dengan terapi pengganti hormon yang biasa dilakukan. Berdasarkan hal-hal diatas, isoflavon diduga mempunyai fungsi ganda terhadap menopause : *f*Anti estrogenic effect pada saat hormon estrogen berlebihan, yang dapat menurunkan resiko kanker payudara pada pre-menopausal wanita. Efek estrogenik pada saat estrogen alami berkurang jumlahnya, yang menguntungkan dalam mencegah penyakit kardiovaskuler, osteoporosis dan sistem vesomotor pada wanita pre-menopausal dan post-menopausal (Koswara, 2006).



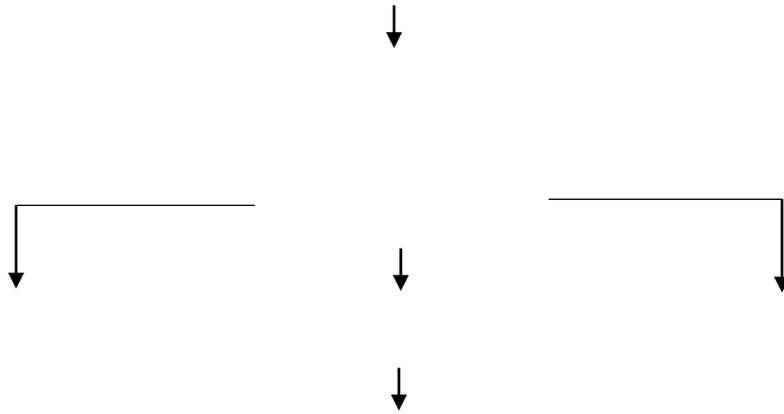
2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan gambaran pewarnaan ER yang dihasilkan dari pengecatan IHC dengan konsentrasi susu kedelai 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% dengan normal serum. Susu kedelai dapat menggantikan normal serum.

2.9 Kerangka Teori

Kanker

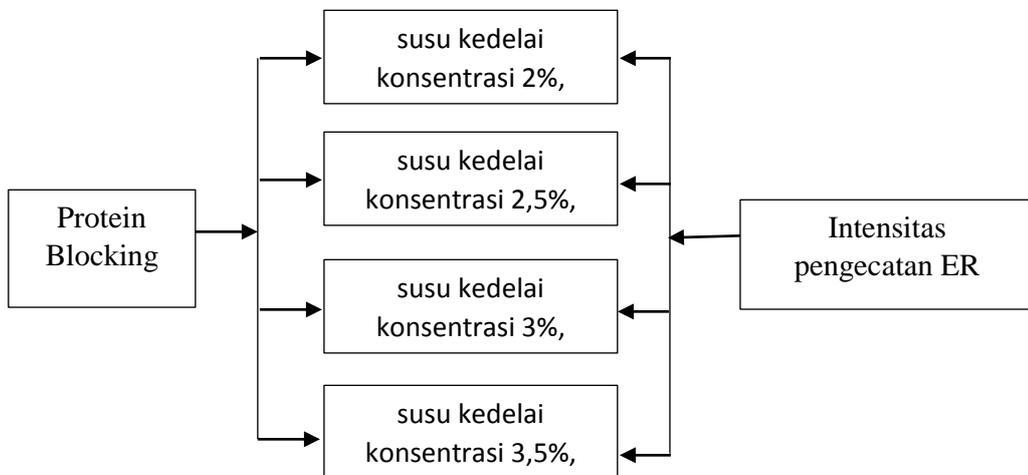
Pengecatan ER
<http://repository.unimus.ac.id>



Gambar 4. Kerangka Teori Penelitian



2.10 Kerangka Konsep



Gambar 5. Kerangka konsep

