

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kanker

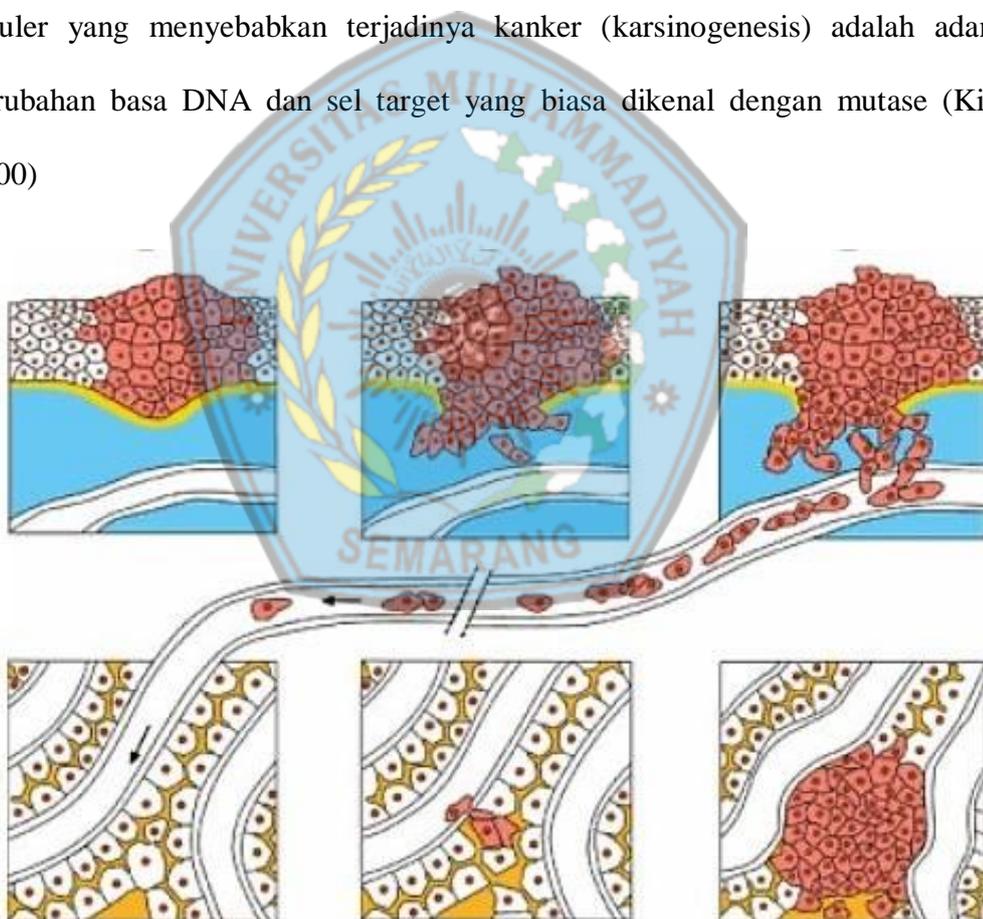
Kanker adalah suatu penyakit sel dengan ciri gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostasis lainnya pada organisme multiseluler. Pada dasarnya kanker dapat terjadi karena adanya perubahan genetic (mutasi), terutama pada gen pengatur pertumbuhan yaitu *onkogen*. Yang menjadi aktif dan *tumor suppressor* gen yang menjadi tidak aktif (Hanahan and Weinberg,2000).

Kanker dibedakan menjadi dua yaitu sarcoma dan karsinoma. Sarcoma bersifat mesensimal misalnya fibrosarkoma, limposarkoma, osteosarkoma. Sedangkan karsinoma bersifat epithelial seperti kanker payudara, kanker lambung, kanker uterus dan kanker kulit. Kanker selalu berkaitan dengan genetika, dalam arti bahwa kanker selalu merupakan konsekuensi dari perubahan DNA (Andrijono, 2007)

2.2 Karsinogenesis

Karsinogenesis adalah proses terbentuknya kanker dan mekanisme multi tahap yang dihasilkan dari akumulasi kesalahan pada pengaturan jalur vital. Karsinogenesis meliputi sebab-sebab yang bekerja pada semua jenis tumor, tetapi oleh sebagian besar epidemiologi, klinik dan eksperimental karsinogenesis terutama ditujukan untuk tumor ganas yang dikarenakan memiliki tingkat

berbahaya yang tinggi, sedangkan penyebab semua jenis tumor baik jinak maupun ganas disebut onkogenesis. Proses pembentukan kanker merupakan sekumpulan perubahan pada sejumlah gen yang terlibat dan berperan dalam system sinyal sel, pertumbuhan, siklus sel, differensiasi, angiogenesis, dan respon atau perbaikan terhadap kerusakan pada DNA. Dalam sel kanker, banyak gen yang berbeda mungkin mengalami perubahan baik pada struktur atau jumlah dalam ratusan bahkan ribuan gen yang dapat diekspresikan secara berbeda. Dasar perubahan seluler yang menyebabkan terjadinya kanker (karsinogenesis) adalah adanya perubahan basa DNA dan sel target yang biasa dikenal dengan mutase (King, 2000)



Gambar 1. Proses menyeluruh dari metastasis sel kanker

2.3 Human Epidermal Growth Factor (HER-2/neu)

Ploriferasi dan diferensiasi pada sel normal diatur oleh gen yang disebut proto-onkogen. Proto-onkogen dapat mengalami mutase menjadi onkoen, yaitu gen yang produksiya berkaitan dengan terjadinya pertumbuhan sel kanker. onkogen dihasilkan oleh protein disebut onkoprotein. Efek dari aktifitas onkogen produksi reseptor factor pertumbuhan yang tidak sempurna sehingga pertumbuhan akan terus menerus walaupun tidak ada rangsangan dari luar. Salah satu contoh produksi reseptor pertumbuhan tersebut adalah HER-2 (Human-epidermal Growth Factor Receptor-2).

HER2/neu merupakan suatu protookogen yang termasuk dalam golongan *epidermal growth factor receptor* (EGFR). Gen HER2/neu berlokasi pada kromosom 17q21, mengkode 185 kD glikoprotein transmembrane dengan aktifitas tyrosin kinase yang berperan dalam proses tranduksi sinyal untuk proliferasi dan diferensiasi sel kanker. HER2/neu adalah suatu protein yang menunjukkan tingkat agresivitas yang tinggi terhadap kanker payudara. Protein ini dijumpai pada permukaan dari sel epitel dan dalam keadaan normal berfungsi sebagai reseptor pertumbuhan sel. Kurang lebih 25-35% karsinoma payudara mampu melakukan amplifikasi pada gen HER2/neu atau over-ekspresi dari hasil proteinnya. Over-ekspresi dari reseptor karsioma payudara menunjukkan peningkatan resiko untuk terjadinya kekambuhan dan prognosis jelek. Pasien dengan HER2/neu yang normal memberi hasil prognosis yang baik dan memberi peningkatan survival (Laksmi, 2009)

Reseptor HER2 dianggap sebagai *orphan receptor* karena tidak memiliki ligan spesifik sehingga tidak dapat dikenali dan diaktifkan oleh ligan EGF. Sedangkan reseptor dari anggota family HER2 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 HER2, sehingga membentuk kompleks reseptor heterodimer. Oleh karena itu, ligan (EGF) akan mengikat kompleks reseptor heterodimer pada permukaan sel sehingga menyebabkan aktivasi protein intrinsic tirosin kinase. Hasilnya adalah transmisi sinyal *growth factor* akan melewati membran sel menuju bagian intraseluler dari nucleus, sehingga akan mengaktifkan gen HER2 (Brennan PJ, *et al*, 2000)

2.3.1 Hubungan HER2 dengan Kanker Payudara

Aplifikasi gen HER-2 pada kanker payudara diperkirakan 20-30% peningkatan ekspresi gen HER2 menyebabkan peningkatan proliferasi, antiapoptosis, angiogenesis dan metastasis. Aktivasi gen HER-2 memerlukan heterodimer dengan reseptor dari familyHER lainnya.

Namun, homodimer atau heterodimer reseptor dari family HER-2 memiliki perbedaan tingkat stimulasi mitogenik. Kompleks reseptor heterodimer HER-2 dengan HER-3 merupakan kompleks reseptor yang sering ditemukan pada sel kanker.

2.4 Imunohistokimia (IHC)

Nama imunohistokimia diambil dari nama “*immune*” yang berarti penggunaan antibody sebagai landasan prinsip dasar sedangkan “*histo*” menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia ini sering digunakan dalam pengukuran dan identifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel, serta digunakan untuk penelitian dasar, misalnya; untuk mengetahui distribusi dan lokasi *biomarker* ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan dalam tubuh (Ramos vara, 2005). Imunohistokimia adalah suatu metode perwarnaan bahan aktif didalam jaringan yang berdasarkan prinsip-prinsip dasar imunologi atau pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti bahan aktif (antibodi). Bahan aktif tersebut berupa protei, karbohidrat, asam nuklet, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat, 2002).

Immunohistochemistry (IHC) merupakan kombinasi teknik histologi, imunologi dan biokimia untuk mendeteksi komponen spesifik dalam jaringan dengan konsep reaksi antigen-antibodi. *Immunohistochemistry* memungkinkan visualisasi distribusi dan lokalisasi komponen selular spesifik dalam sel atau jaringan. Keberadaan protein komponen selular dalam sel atau jaringan merupakan antigen. Visualisasi interaksi antigen-antibodi dilakukan dengan pelabelan warna tertentu (*chromogen*) melalui serangkaian reaksi enzimatik.

2.4.1 Tahapan Dasar IHC

Pengecatan IHC terdiri dari beberapa langkah atau tahapan, yaitu

2.4.1.1 Fiksasi dan Processing Jaringan

Pada tahapan ini buffer formalin 10% digunakan sebagai cairan fiksasi yang dalam keadaan netral selama 24-72 jam. *Processing* jaringan terdiri dari fiksasi fiksasi dehidrasi dan *embedding* atau penanaman yang dilakukan pada blok parafin agar jaringan menjadi kaku (Dabbs, 2013). Adapun tahapan fiksasi dan processing jaringan adalah :

a. Fiksasi

Fiksasi merupakan suatu usaha untuk mempertahankan elemen-elemen sel/jaringan agar tetap pada tempatnya dan tidak mengalami perubahan bentuk dan ukuran.

b. Dehidrasi

Pada tahap dehidrasi penarikan molekul air dari dalam jaringan. Sel pada jaringan hidup mengandung air $\pm 85\%$, air tidak tercampur dengan paraffin sehingga perlu dehidrasi.

c. Penjernihan/clearing.

Penjernihan berfungsi membuat jaringan menjadi jernih dan transparan

d. Embedding

Embedding adalah proses memasukkan jaringan kedalam parafin cair untuk dibuat blok yang padat.

e. Mounting

Menempelkan potongan jaringan yang baik ke obyek glass

f. Staining

Staining merupakan proses pewarnaan preparat. Secara umum zat warna yang bersifat asam akan mewarnai bagian sel yang bersifat basa dan sebaliknya cat netral.

2.4.1.2 Antigen Retrieval

Metode antigen retrieval yang sering digunakan dalam IHC adalah enzimatik dan juga heat-induced epitope retrieval (HIER) (Ramos-vara, 2005). HIER memiliki efek yang baik untuk membantu membuka *mask* pada epitope pada preparat yang difiksasi dengan formaldehyde. Proses ini bertujuan untuk menghasilkan struktur protein yang rusak pada tahap fiksasi.

2.4.1.3 Endogenous Blocking

Menurut Dabbs 20013, pada tahap ini larutan yang biasa digunakan untuk *endogenous blocking* adalah H₂O₂. Proses *endogenous blocking* dilakukan untuk menghindari terjadinya positif palsu yang diakibatkan dari beberapa enzim seperti peroksidase yang terdapat pada *paraffin section* dan *frozen section* yang tidak akan mengalami denturasi saat proses fiksasi.

2.4.1.4 Protein blocking

Protein blocking sebagai penghambat permanen yang hanya ditambahkan sekali setelah permukaan dilapisi dengan molekul tangkapan. *Protein blocking* biasanya ditambahkan sebagai pengencer yang digunakan untuk pengujian selanjutnya dan untuk menstabilkan biomolekul terikat pada permukaan. Proses *protein blocking* diterapkan sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan pada pengecatan IHC. Prinsip dari proses *protein blocking* adalah larutan protein yang ditambahkan akan mengikat protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibod (Latja, 2007)

a. Protein solution

Pada metode ini penggunaan *protein solution* antibodi tidak dapat mengikat epitope nonspesifik, metode ini jauh lebih murah dan bisa bekerja dengan baik pada antibodi monoklonal. Adapun protein solution yang biasa digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) 0,1-0,5% dan gelatin (Latja, 2007)

b. Telur puyuh

Telur puyuh adalah sumber protein hewani yang relative murah dibandingkan dengan sumber protein telur lainnya. Zat yang terkandung dalam telur puyuh lebih baik dari pada yang lainnya. Kandungan protein yang terdapat pada telur puyuh juga tidak kalah dengan kandungan protein telur unggas lainnya. Terdapat 13,1% kandungan protein telur puyuh disbanding dengan kandungan protein ayam ras yang hanya 12,7% (Listiyowati dan Roospatasri, 2005). Telur puyuh terdiri atas

putih telur (albumin) 47,4%, kuning telur (*yolk*) 31,9% dan kerabang serta membrane kerabang 20,7%.

2.4.1.5 Inkubasi dengan Antibodi

Pada tahap ini antibodi yang nantinya akan berikatan secara spesifik dengan antigen atau protein yang terdapat dalam jaringan. Antibodi yang digunakan untuk menginkubasi adalah antibodi monoclonal maupun poloklonal (Dabbs, 2013)

2.5 Metode pengecatan IHC

Metode pengecatan IHC digunakan untuk mendeteksi atau melokalisasi dan menampilkan antigen yang berada dalam jaringan (Bancroft dan Gamble, 2008) adapun metode-metode yang digunakan yaitu:

2.5.1 Metode Langsung (*Direct*)

a. Traditional Direct

Metode pengecatan imunohistokimia secara langsung (*direct*) dengan cara tradisional ini merupakan metode yang menggunakan satu macam antibodi saja, antibodi tersebut yaitu antibodi primer yang sudah berlabel dan akan bereaksi secara langsung dengan antigen pada preparat sitologi maupun histologi untuk mengenali antigen spesifiknya (Howard dan Kaser, 2014)

b. New Direct

Menurut Bancroft dan Gamble 2008, antibodi primer dan enzim peroksidase banyak diletakkan pada *backbone* polimer dekstran akan meningkatkan sinyal amplifikasi dan menimbulkan tingkat sensitivitas yang sangat tinggi dibandingkan dengan teknik *traditional direct*, akan tetapi teknik ini sangat jarang digunakan

dalam pengecatan IHC karena keterbatasan dari jumlah antibodi primer yang tersedia pada teknik EPOS (*Enhanced Polymer One-Step Staining*).

2.5.2 Metode Tidak Langsung (*Indirect*)

Pada pengecatan IHC metode *indirect* ini antibodi yang digunakan ialah antibodi primer. Metode ini terdapat dua atau lebih lapisan dari reagen yang digunakan, yang dimana lapisan terakhirlah yang akan diberi label. Metode ini lebih rumit dan pengerjaannya lama bila dibandingkan dengan metode *direct*. Kelebihan dari metode ini adalah memiliki tingkat yang sensitivitas lebih tinggi atau beberapa ribu kali lebih sensitif dari pada metode *direct*, oleh karena itu metode ini lebih banyak digunakan dalam pemeriksaan IHC (Howard dan Kaser 2014). Ada beberapa macam, metode tidak langsung yaitu:

a. Metode Immogold silver staining (IGSS)

Menurut Bancroft dan Gamble tahun 2008, Metode ini diperkenalkan oleh Faulk dan Tayler pada 1971, dengan menggunakan koloid emas sebagai label. Partikel emas tersebut ditingkatkan dengan penambahan lapisan logam peram untuk menghasilkan partikel logam perak yang melapisi marker koloid emas sehingga dapat dilihat dengan teknik PAP (peroxidase-Antiperoxidase), tetapi menghasilkan *background* yang buruk.

b. Avidin-biotin Complex

Metode ini terdiri dari tiga lapisan, yang pertama terdiri dari antibodi primer yang tidak berlabel, di ikuti dengan *biotinylated*. Lapisan ketiga kompleks *enzyme-labeled* biotin dan streptavidin. Baik peroksidase maupun alkali fosfatase

dapat digunakan sebagai enzim, dengan diikuti oleh kromogen (Bancroft dan Gamble, 2008)

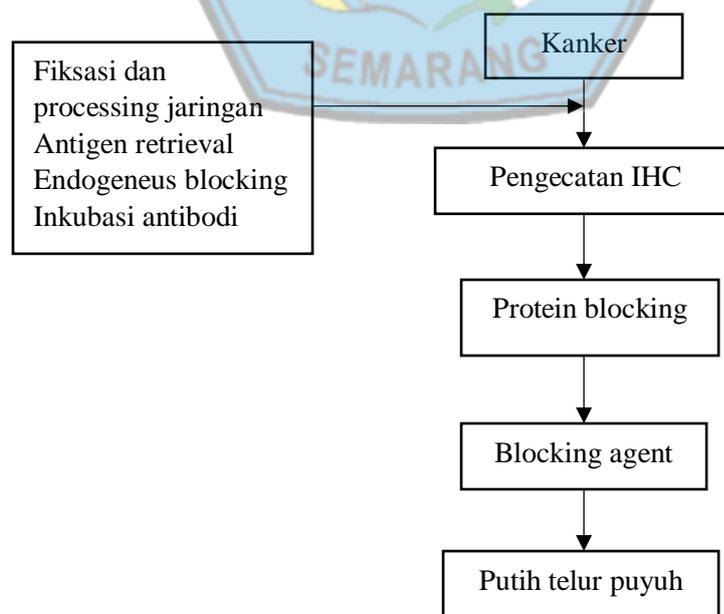
c. Metode Pelabelan Hapten

Hepten dikaitkan pada antibodi primer dan kompleks diciptakan menggunakan antibodi anti-hepten dengan hapten berlabel enzim peroksidase maupun haptem berlabel PAP (Bancroft dan Gamble, 2008)

d. Metode Enzim-Antienzim

Metode ini digunakan dalam dua bentuk, yaitu metode peroksidase-antiperoksidase (PAP) dan alkali fosfatase-antialkali fosfatase (APAAP) (Dabbs, 2013). Metode hampir mirip dengan PAP, tetapi enzim yang digunakan pada metode ini berbeda. Metode ini tidak banyak digunakan karena reagen yang digunakan tidak selalu tersedia (Dabbs, 2013).

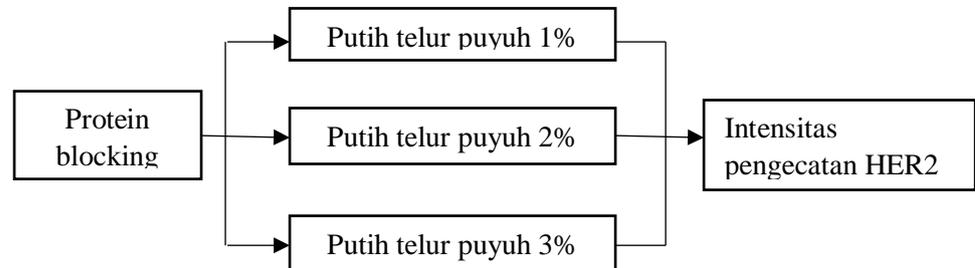
2.6 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka teori penelitian

2.7 Alur penelitian

2.7.1 Kerangka konsep



Gambar 3. Kerangka konsep penelitian

2.8 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan intensitas HER2 yang dihasilkan dari pengecatan IHC menggunakan putih telur puyuh dan Normal serum.

