

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Kanker**

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Kanker paru, hati, perut, kolorektal, dan kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya. Kanker merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan kematian terbesar pada abad ini. Pada tahun-tahun terakhir ini tampak adanya peningkatan kasus kanker yang disebabkan oleh pola hidup yang salah seperti kebiasaan merokok dan minuman beralkohol. Kanker merupakan satu jenis penyakit yang ditandai dengan pertumbuhan sel yang abnormal dan tidak terkendali dari sel-sel tubuh (Yuniar dan Rohyani, 2009).

Salah satu kanker yang paling sering dijumpai adalah kanker payudara, yakni kanker yang sering dijumpai pada wanita setelah kanker rahim. Prognosis kanker payudara dipengaruhi oleh ukuran tumor, metastasis, derajat diferensiasi, dan jenis histopatologi (Firasi dan Yudhanto, 2016).

Kanker payudara merupakan masalah kesehatan baik di negara maju maupun negara berkembang. Angka penderita kanker payudara di Indonesia menurut Departemen Kesehatan sebesar 876.665 orang. Rata-rata penderita kanker payudara di Indonesia adalah 10 dari 100 ribu perempuan, menjadikan penyakit ini berada di urutan kedua setelah kanker mulut rahim. Kanker payudara masih menjadi masalah besar di Indonesia, karena 68,6% wanita dengan kanker payudara berobat ke dokter pada stadium lanjut lokal (IIIa dan IIIb), sedangkan stadium dini (stadium I dan II) hanya 22,4%. Pada tahun 2005 di Kota Semarang, kasus kematian tertinggi akibat kanker adalah kematian akibat kanker payudara, di mana insidensi kanker payudara di Kota Semarang adalah tertinggi untuk seluruh kanker di Kota Semarang.

#### **B. *Estrogen Receptor* (ER)**

Karsinoma endometrium merupakan tumor ganas organ reproduksi wanita yang paling sering dijumpai, dengan insidennya yang terus meningkat, terutama

pada wanita-wanita *postmenopause* di negara-negara berkembang. Perkembangan karsinoma endometrium sangat erat kaitannya dengan hormon estrogen. Paparan estrogen dalam waktu panjang tanpa dihalangi efek progesteron dapat meningkatkan risiko terjadinya karsinoma endometrium. Epitel glandular endometrium merupakan lokasi keganasan yang sangat responsif terhadap hormon, dalam hal ini akan diekspresikan melalui *estrogen receptor* (ER) dan *progesterone receptor* (PR). ER dan PR yang akan berikatan dengan hormon estrogen dan progesteron pada jaringan endometrium relatif akan berkurang jumlahnya pada karsinoma endometrium, dan hilangnya reseptor-reseptor tersebut merupakan bagian dari karsinogenesis endometrium. Beberapa parameter histopatologi, seperti tipe dan *grading* histopatologi akan mempengaruhi ekspresi reseptor-reseptor tersebut. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis ekspresi ER pada tipe dan *grading* histopatologi karsinoma endometrium. (Grundker *et al*, 2008).

Estrogen memainkan peranan penting dalam patogenesis karsinoma endometrium. Estrogen akan menstimulasi pertumbuhan sel-sel endometrium menjadi karsinoma endometrium, sedangkan progesteron akan bertindak sebagai penghalangnya. Mekanisme kerja estrogen sebagai promotor langsung dalam karsinogenesis endometrium ini diperantarai oleh reseptor yang terdapat dalam jaringan endometrium. Epitel glandular yang merupakan asal dari munculnya keganasan ini sangat responsif terhadap hormon, yang dalam hal ini akan diekspresikan melalui *estrogen receptor* (ER). Hilangnya ekspresi ER merupakan bagian penting dalam karsinogenesis endometrium. Selain pada endometrium, hormon estrogen dan reseptornya juga berperan dalam perkembangan tumor payudara, ovarium, kolon, dan prostat. (Srijaipracharoen *et al*, 2010).

Beberapa parameter histopatologi seperti tipe histopatologi, *grading* histopatologi, invasi miometrium, invasi limfovaskular, dan *stage* tumor mempengaruhi ekspresi ER. Menurut beberapa penelitian, ER akan terekspresi pada tumor-tumor yang *low grade* (biasanya tipe *endometrioid grade* 1 dan 2), tanpa dijumpai invasi miometrium dan limfovaskular, sehingga dapat dikatakan bahwa ekspresi dari reseptor-reseptor ini dihubungkan dengan faktor prognostik

yang baik. Hasil penelitian Stoian *et al.* (2011) terhadap 22 kasus karsinoma endometrium di Craiova menunjukkan bahwa ekspresi ER tertampil pada 19 kasus (86,3%). Ekspresi ER lebih banyak tertampil terutama pada tumor-tumor *grade* 1 dan 2 dengan invasi miometrium yang minimal (tidak melebihi separuh ketebalan miometrium), dan tumor-tumor *stage* I dan II. Sedangkan hasil penelitian Srijaipracharoen *et al.* (2010) terhadap 108 kasus karsinoma endometrium di Bangkok menunjukkan bahwa ER terekspresi pada 64 kasus (59,3%). Sama halnya pada hasil penelitian Stoian *et al.*, ER terekspresi terutama pada tumor-tumor dengan *grade* 1 dan 2, dengan invasi miometrium minimal; tidak dijumpai invasi limfovaskular, serviks, dan nodus limfatik; *stage* I-II dan dengan tipe *endometrioid*. (Stoian *et al.*, 2011).

Penelitian terdahulu tentang penyakit keganasan pada wanita lebih fokus pada karsinoma payudara, dibanding dengan karsinoma endometrium. Namun, karena perubahan pola hidup, maka prevalensi karsinoma endometrium semakin meningkat dan membutuhkan penanganan dan terapi yang lebih tepat. Oleh karena itu, maka kesempatan ini akan dilakukan penelitian untuk menganalisis ekspresi ER. (Causa *et al.*, 2017)

### C. IHC (Imunohistokimia)

IHC (Imunohistokimia) merupakan suatu proses untuk menentukan 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)

#### 2.1. *Blocking dan Prosesing jaringan*

Tahapan dasar IHC pada umumnya terdiri dari pengecatan IHC, larutan fiksasi yang digunakan adalah Buffer Formalin 10%. Buffer Formalin yang digunakan berada dalam suasana netral atau pH diantara 7-7,4 selama 24-72 jam (Sudiana, 2005). *Prosesing* jaringan sendiri meliputi beberapa tahapan, yaitu fiksasi, dehidrasi, dan penanaman jaringan pada blok paraffin atau yang sering disebut dengan *mbedding* (Muntiha, 2001)

Jaringan kemudian dapat diiris atau digunakan seluruhnya, tergantung pada tujuan percobaan atau jaringan itu sendiri. Sebelum dipotong, sampel jaringan mungkin tertanam dalam media, seperti lilin parafin atau cryomedia. Bagian dapat diiris pada berbagai instrumen, paling umum *mikrotom*, *cryostat*, atau *vibratome*. Spesimen biasanya diiris pada kisaran 3  $\mu\text{m}$ -5  $\mu\text{m}$ . Irisan kemudian dipasang pada slide, didehidrasi menggunakan pencucian alkohol dengan konsentrasi yang meningkat (misalnya, 50%, 75%, 90%, 95%, dan 100%), dan dibersihkan menggunakan *xylene* sebelum dicitrakan di bawah mikroskop.

Bergantung pada metode fiksasi dan pengawetan jaringan, sampel mungkin memerlukan langkah-langkah tambahan untuk membuat epitop tersedia untuk pengikatan antibodi, termasuk deparaffinisasi dan pengambilan antigen. Untuk jaringan yang tertanam parafin formalin, pengambilan antigen sering diperlukan, dan melibatkan pra-perawatan bagian dengan panas atau *protease*.

## **2.2. Antigen Retrieval**

Proses antigen retrieval bertujuan untuk mengembalikan struktur protein atau antigen yang rusak pada saat proses fiksasi. Beberapa larutan yang digunakan dalam proses antigen retrieval adalah sodium citrat, EDTA, Tris, urea, sukrosa, dan larutan komersial yang disediakan oleh kit (Platero, 2009).

## **2.3. Endogenous Blocking**

Proses *endogenous blocking* merupakan sesuatu yang sangat penting. Tingkat kerentanan dari enzim untuk mengalami denaturasi dan inaktivasi selama proses fiksasi sangat bervariasi. Beberapa enzim seperti peroksidase yang terdapat pada *paraffin section* dan *frozen section* tidak akan mengalami denaturasi saat proses fiksasi sehingga diperlukan proses *endogenous blocking* untuk menghindari terjadinya *false positive* (positif palsu). Larutan yang biasa digunakan untuk *endogenous blocking* adalah  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Dabbs, 2013).

## **2.4. Protein Blocking**

*Protein blocking* diterapkan sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan pada pengecatan IHC. Prinsip dari proses *protein blocking* menurut Latja (2007) adalah larutan protein (*blocking*

*agent*) yang ditambahkan akan meningkat protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibodi.

Cara yang paling efektif untuk meminimalisir pewarnaan nonspesifik adalah dengan menambahkan larutan protein (Bancroft dan Gamble, 2008). Proses *protein blocking* pada prosedur umum pengecatan IHC dapat dilakukan dengan menginkubasi preparat selama 30-60 menit pada suhu kamar (20-25°C) atau 4°C menggunakan *blocking agent* (Latja, 2007). Beberapa *blocking agent* untuk *protein blocking* menurut Radig (2013), yaitu :

**a. Normal Serum**

*Normal serum* dapat dikatakan sebagai *blocking agent* yang baik dalam proses *protein blocking*, tetapi harga dari *normal serum* relatif lebih mahal dibandingkan dengan *blocking agent* yang lain. *Normal serum* yang digunakan harus berasal dari spesies yang sama dengan antibodi sekunder. *Normal serum* yang mengandung anribodi akan berikatan dengan epitop nonspesifik pada jaringan sehingga menghalangi ikatan nonspesifik yang mungkin dapat terjadi.

**b. Protein Solution**

Penggunaan *protein solution* pada metode ini teorinya adalah antibodi tidak dapat mengikat epitop nonspesifik sebaik *protein solution*. Metode ini jauh lebih ekonomis dan dapat bekerja baik pada antibodi monoklonal. *Protein solution* yang biasanya digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) 0,1-0,5%, gelatin, susu skim, dan air liur pagi.

**D. Air Liur Pagi**

Saliva merupakan cairan eksokrin yang dikeluarkan ke dalam rongga mulut melalui kelenjar saliva. Secara umum, saliva berperan dalam proses pencernaan makanan, pengaturan keseimbangan air, menjaga integritas gigi, aktivitas antibakterial, buffer dan berperan penting bagi kesehatan rongga mulut<sup>1</sup>. Kecepatan aliran sekresi saliva berubah-ubah pada individu atau bersifat kondisional sesuai dengan fungsi waktu, yaitu sekresi saliva mencapai minimal pada saat tidak distimulasi dan mencapai maksimal pada saat distimulasi<sup>2</sup>. Saliva juga tidak diproduksi dalam jumlah besar secara tetap, hanya pada waktu tertentu

saja sekresi saliva meningkat. Rata-rata aliran saliva 20ml/jam pada saat istirahat, 150ml/jam pada saat makan dan 20-50ml selama tidur 3.

Kenaikan sekresi saliva dapat mempengaruhi susunan ion-ion dalam saliva, hal ini disebabkan saat terjadi kenaikan kecepatan sekresi saliva, ion-ion banyak dikeluarkan menuju muara kelenjar saliva. Komposisi saliva terdiri dari 94,0%-99,5% air, bahan organik dan anorganik. Komponen anorganik saliva antara lain  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Sedangkan komponen organik utama adalah protein, selain itu juga ditemukan lipida, glukosa, asam amino, ureum, amoniak dan vitamin3. Protein pada air liur terdapat di enzim lisozim, Lisozim bisa didapat dari berbagai sumber bahan pangan dan kandungan masing-masing berbeda (Belitz, *et al.*, 2009). Berikut ini adalah kandungan lisozim di beberapa sumber bahan seperti pada Tabel 1. Kandungan lisozim di dalam beberapa sumber bahan (Lesnierowski, 2007).

#### E. Lisozim

Lisozim merupakan protein globular, kira-kira berukuran 14,4 kDa. Molekul enzim merupakan kompleks padat di dalam bentuk yang sama pada senyawa yang berbentuk *ellips* dengan protein lain dan dimensi berukuran 4,5 x 3,0 x 3,0 nm (Lesnierowski, 2003).

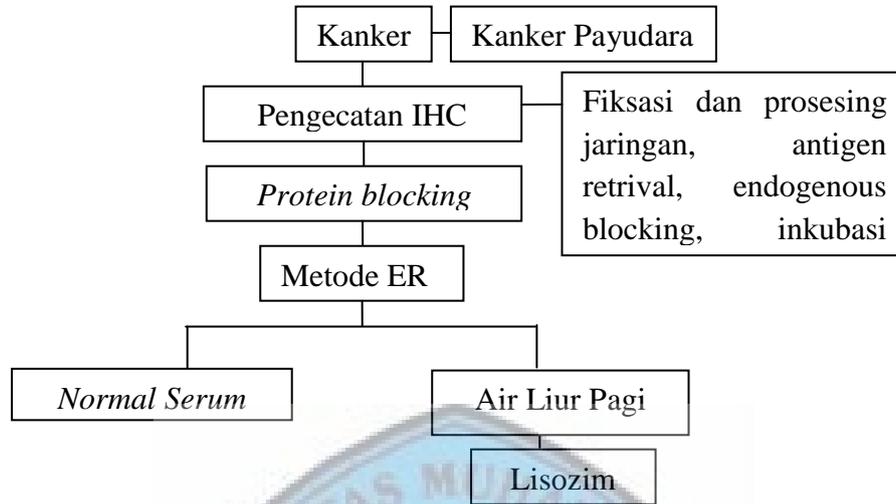
Tabel 2. Perbandingan komposisi *Unstimulated* saliva dengan *Stimulated* saliva.

	<i>Unstimulated</i> saliva	<i>Stimulated</i> saliva
<i>Water</i>	99.55%	99.53%
<i>Solids</i>	0.45%	0.47%

### Organic Constituents

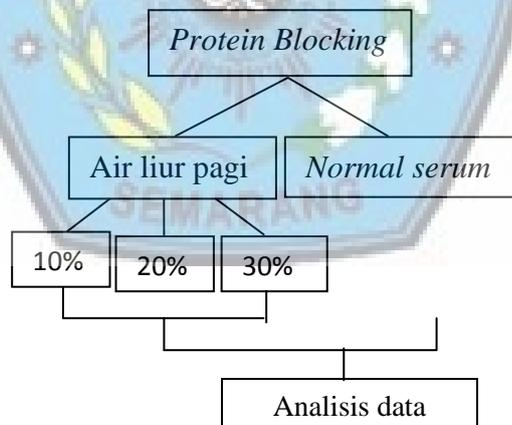
Total protein (mg/L)	1630 ± 720	1360 ± 290
<i>Secretory IgA</i> (mg/L)	76.1 ± 40.2	37.8 ± 22.5
<i>MUC5B</i> (mg/L)	830 ± 480	460 ± 200
<i>MUC7</i> (mg/L)	440 ± 520	320 ± 330
<i>Amylase</i> (U=mg maltose/mL/min)	317 ± 290	453 ± 390
<i>Lysozyme</i> (mg/L)	28.9 ± 12.6	23.2 ± 10.7
<i>Lactoferrin</i> (mg/L)	8.4 ± 10.3	5.5 ± 4.7
<i>Statherin</i> (µmol/L)	4.93 ± 0.61	
<i>Albumin</i> (mg/L)	51.2 ± 49.0	60.9 ± 53.0
<i>Glucose</i> (µmol/L)	79.4 ± 33.3	32.4 ± 27.1
<i>Lactate</i> (mmol/L)	0.20 ± 0.24	0.22 ± 0.17
Total lipids (mg/L)	12.1 ± 6.3	13.6
<i>Amino acids</i> (µmol/L)	780	567

## Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka teori

## Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep

## Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan intensitas ER yang dihasilkan dari pengecatan IHC baik menggunakan air liur pagi maupun *normal serum*.