

**DETEKSI EKSPRESI GEN TNF- α
PADA PENDERITA KANKER PAYUDARA
DI MAKASSAR**



**DIAYANI SUKARDI
N121 06 007**



F
SKR - MP10
SUK
d

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**DETEKSI EKSPRESI GEN TNF- α
PADA PENDERITA KANKER PAYUDARA
DI MAKASSAR**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**DIAYANI SUKARDI
N121 06 007**

**PROGRAM KONSENTRASI
TEKNOLOGI LABORATORIUM KESEHATAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

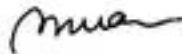
DETEKSI EKSPRESI GEN TNF- α PADA PENDERITA KANKER
PAYUDARA DI MAKASSAR

DIAYANI SUKARDI

N121 06 007

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama,



Prof.Dr.rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt.
NIP. 19670319 199203 2 002

Pembimbing Pertama,



Prof. Moch. Hatta, MD.SP.MK,PhD.
NIP. 131 468 462

Pembimbing Kedua,



Usmar, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 197101091997021001

Pada Tanggal: Agustus 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dan semoga skripsi ini bernilai ibadah disisi-Nya.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak kendala dan hambatan yang dihadapi. Namun berkat dukungan dan bantuan dari semua pihak dan seizin Allah SWT, penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, penulis dengan segala kerendahan dan ketulusan hati menghaturkan banyak terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Prof. Dr. rer.nat. Mariyanti A. Manggau, Apt selaku Pembimbing Utama, Prof. Mochammad Hatta, MD. Sp.MK, Ph.D selaku pembimbing pertama, dan Usmar, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing kedua.

Demikian pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Pembantu Dekan I, Pembantu Dekan II, Pembantu Dekan III, Ketua Program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Fakultas Farmasi, para dosen, dan seluruh staf dan karyawan Fakultas Farmasi Program Konsentrasi Teknologi Laboratorium Kesehatan Universitas Hasanuddin.

Terkhusus lagi kepada kedua orang tua dan keluarga yang telah memberikan dukungan moril maupun materil, saahabat, teman seangkatan, dan kepada semua pihak, yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang secara langsung maupun tidak langsung telah

memberikan bantuan, semoga semua amal dan budi baik yang telah diberikan mendapat balasan yang setimpal dari Allah SWT.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua dan bernilai ibadah disisiNya dan semoga Allah SWT senantiasa memridhai dan melindungi setiap langkah dan pengabdian kita.

Makassar, Maret 2010

Diayani Sukardi

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian deteksi ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara di Makassar. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi adanya ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara. TNF- α merupakan salah satu sistem imun yang berperan dalam menghancurkan sel-sel tumor dan menghambat penyebaran sel kanker. Pada penderita kanker dengan berbagai macam tipe kanker terdapat sirkulasi TNF- α yang sangat tinggi dan tidak normal. Selain itu, sirkulasi TNF- α yang sangat tinggi telah dikorelasikan dengan stadium tumor, tingkat komplikasi, dan waktu bertahan hidup yang singkat pada penderita kanker. Jumlah sampel yang digunakan sebanyak 10 sampel dari jaringan kanker payudara dan 10 sampel dari darah orang sehat. Uji teknik PCR dilakukan di Laboratorium Imunologi dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara lebih meningkat dibandingkan dengan orang sehat.

ABSTRACT

A research has been about the Detection of TNF- α Gene Expression in Breast Cancer in Makassar. The aim of this research was to detect the existence of TNF- α gene expression in breast cancer. TNF- α is an immune system that takes a role in crushing tumor cell and inhibit the metastases of cancer cells. In any kinds of cancer sufferer, there is a very high and abnormal TNF- α circulation. Besides, a high and abnormal TNF- α circulation has been correlated with tumor stage, complication levels, and short surviving time on cancer sufferer. Ten samples were taken from breast cancer patience cells and ten samples were taken from health body blood. Technical assay of PCR was done in Molecular Biology and Immunology Laboratory of Medical Faculty of Hasanuddin University. The result indicated that TNF- α gene expression in breast cancer patience cell was much more than in health body cell.

DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Tinjauan Umum Kanker.....	4
II.1.1 Epidemiologi.....	5
II.1.2 Penyebab Kanker Payudara.....	5
II.1.3 Patogenitas Kanker.....	6
II.1.4 Penyebaran Kanker.....	10
II.2 Imunitas Tubuh.....	12
II.2.1 Monosit/Makrofag.. ..	13
II.2.2 Sitokin.....	13
II.3 Teknik PCR.....	15
II.3.1 Ekstraksi RNA.....	16
II.3.2 Amplifikasi dengan Teknik RT-PCR.....	17

II.3.3 Elektroforesis	19
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	20
III.1 Desain Penelitian.....	20
III.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
III.3 Subjek dan Cara Pemilihan Subjek Penelitian.....	20
III.4 Kriteria Sampel.....	20
III.5 Jenis Sampel.....	21
III.6 Defenisi Operasional.....	21
III.7 Alat dan Bahan.....	21
III.7.1 Alat Penelitian.....	21
III.7.2 Bahan Penelitian.....	21
III.8 Prosedur Kerja.....	22
III.8.1 Pengambilan Sampel.....	22
III.8.2 Pemeriksaan PCR.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
IV.1 Hasil Penelitian.....	26
IV.2 Pembahasan.....	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	32
V.1 Kesimpulan.....	32
V.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Hasil penelitian sampel jaringan kanker payudara.....	26
2. Data ekspresi gen TNF- α pada sampel jaringan kanker Payudara.....	26
3. Hasil penelitian sampel darah vena orang sehat	27
4. Data ekspresi gen TNF- α pada sampel darah orang sehat...	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Skema proses terjadinya kanker.....	9
2. Hasil PCR sampel jaringan kanker payudara.....	27
3. Hasil PCR sampel darah vena orang sehat.....	28
4. Sampel jaringan kanker payudara dan darah vena orang sehat.....	45
5. Hasil ekstraksi jaringan kanker payudara dan darah vena orang sehat.....	45
6. Proses Amplifikasi pada PCR.....	46
7. Proses elektroforesis.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Alur Penelitian	36
2. DNA Manusia untuk TNF- α	37
3. Ekstraksi RNA TNF- α dari Jaringan Kanker Payudara dengan Metode BOOM.....	40
4. Ekstraksi RNA TNF- α dari Darah Vena Orang Sehat dengan Metode BOOM.....	41
5. Amplifikasi RNA TNF- α dengan Teknik RT-PCR.....	42
6. Analisa Hasil PCR dengan Metode Elektroforesis.....	43
7. Foto Hasil Penelitian.....	44

BAB I

PENDAHULUAN

Kanker merupakan penyakit dimana sel tubuh berkembang, berubah, dan menduplikasikan diri diluar kendali. Biasanya nama kanker diberi berdasar bagian tubuh dimana kanker pertama kali muncul. Jadi kanker payudara merujuk pada pertumbuhan serta perkembangbiakan sel abnormal yang muncul pada jaringan payudara. Perkembangbiakan sel yang abnormal ini diakibatkan oleh adanya ekspresi gen yang tidak terkontrol oleh sistem yang ada. Kanker payudara merupakan salah satu kanker berbahaya yang sudah banyak menimbulkan korban. Di Indonesia kanker payudara menduduki peringkat kedua setelah kanker leher rahim yang paling banyak menyerang wanita Indonesia (1,2).

Tubuh dilengkapi dengan berbagai sistem pertahanan yang dalam keadaan normal dapat melindungi tubuh terhadap berbagai *invasi*, baik mikroorganisme maupun sel tubuh itu sendiri yang mengalami perubahan menjadi ganas (3). Sel kanker dikenal oleh tubuh sebagai bahan asing, sehingga mekanisme imunologi tubuh akan bereaksi secara humoral maupun seluler. Tubuh mempunyai kemampuan immunosurveillance, yaitu mekanisme yang digunakan oleh tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh semua sel kanker maupun sel yang bermutasi untuk mencegah perkembangan sel kanker tersebut, namun terkadang terjadi immunological escape yaitu sel kanker luput dari pengawasan sistem imun, sehingga terjadilah kanker (4).

Salah satu komponen sistem imun yang berperan dalam melawan sel kanker yaitu *Tumor Necrosis Factor* (TNF). TNF merupakan salah satu produk dari sitokin yang berfungsi untuk menghancurkan sel-sel tumor dan menghambat penyebaran sel kanker. Inflamasi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik (5). TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk sel T, sel B, sel NK dan sel kupfer (6).

Dengan kemajuan teknologi di bidang biomolekuler digunakan teknik pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi suatu ekspresi gen dari TNF- α yang merupakan suatu teknik biologi molekuler untuk memperbanyak jumlah DNA secara invitro dengan menggunakan enzim polymerase dan perubahan temperatur. Teknik PCR ini merupakan cara yang sangat sensitif dan spesifik dalam menentukan urutan DNA sel dan banyak digunakan sebagai alternatif dalam menegakkan diagnosa penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, dan parasit lain. Selain itu teknik PCR ini digunakan secara luas dalam menentukan urutan DNA yang mengekspresikan sifat-sifat keturunan dan penyakit yang berhubungan dengan kelainan genetik (7).

Berdasarkan pada hal tersebut maka, rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu apakah ada hubungan antara ekspresi gen TNF- α dengan kanker payudara. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi adanya ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara yang dibandingkan dengan orang sehat. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menambah

Salah satu komponen sistem imun yang berperan dalam melawan sel kanker yaitu *Tumor Necrosis Factor* (TNF). TNF merupakan salah satu produk dari sitokin yang berfungsi untuk menghancurkan sel-sel tumor dan menghambat penyebaran sel kanker. Inflamasi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik (5). TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk sel T, sel B, sel NK dan sel kupfer (6).

Dengan kemajuan teknologi di bidang biomolekuler digunakan teknik pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mendeteksi suatu ekspresi gen dari TNF- α yang merupakan suatu teknik biologi molekuler untuk memperbanyak jumlah DNA secara invitro dengan menggunakan enzim polymerase dan perubahan temperatur. Teknik PCR ini merupakan cara yang sangat sensitif dan spesifik dalam menentukan urutan DNA sel dan banyak digunakan sebagai alternatif dalam menegakkan diagnosa penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, dan parasit lain. Selain itu teknik PCR ini digunakan secara luas dalam menentukan urutan DNA yang mengekspresikan sifat-sifat keturunan dan penyakit yang berhubungan dengan kelainan genetik (7).

Berdasarkan pada hal tersebut maka, rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu apakah ada hubungan antara ekspresi gen TNF- α dengan kanker payudara. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi adanya ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara yang dibandingkan dengan orang sehat. Manfaat penelitian ini diharapkan dapat menambah

informasi ilmiah mengenai peranan TNF- α dalam proses imunitas tubuh dan data yang diperoleh dapat dijadikan petunjuk dalam pengembangan penelitian mengenai hal-hal yang berhubungan dengan penyakit kanker payudara di Makassar. Hipotesis dalam penelitian ini yaitu adanya hubungan antara ekspresi gen TNF- α dengan kanker payudara, dimana ekspresi gen TNF- α pada penderita kanker payudara lebih banyak dibandingkan dengan orang sehat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Umum Kanker

Neoplasia atau pertumbuhan baru adalah massa abnormal dari sel-sel yang mengalami proliferasi. Sel-sel neoplasma berasal dari sel-sel yang sebelumnya adalah sel-sel normal, namun selama mengalami perubahan, sel-sel tersebut memperoleh perubahan tertentu yaitu sel neoplasma tumbuh dengan kecepatan yang tidak terkoordinasi dengan kebutuhan hospes dan fungsi yang sangat tidak bergantung pada pengawasan homeostatis sebagian besar sel tubuh lainnya (8).

Neoplasia tidak melakukan tujuan yang bersifat adaptasi yang menguntungkan hospes, tetapi lebih sering membahayakan. Neoplasia dapat dibedakan berdasarkan sifat-sifatnya, yaitu bersifat jinak atau ganas. Kanker adalah istilah umum yang digunakan untuk menunjukkan neoplasia yang bersifat ganas (8).

Kanker adalah penyakit yang ditandai dengan pembelahan sel yang tidak terkendali dan kemampuan sel-sel tersebut untuk menyerang jaringan lainnya, baik dengan pertumbuhan langsung di jaringan yang berseblahan atau dengan migrasi sel ke tempat yang jauh. Setiap orang mempunyai sel kanker di dalam tubuh. Sel-sel kanker ini tidak terlihat dalam tes standar hingga berkembang biak menjadi banyak. Biasanya nama kanker diberikan berdasar bagian tubuh dimana kanker pertama kali

tumbuh. Jadi kanker payudara merujuk pada pertumbuhan serta perkembangbiakan sel abnormal yang muncul pada jaringan payudara (2,9).

II.1.1 Epidemiologi

Kanker payudara adalah kanker yang paling sering pada perempuan, walaupun kanker ini sangat jarang pada laki-laki. Menurut WHO setiap tahun lebih dari 250.000 kasus kanker payudara terdiagnosa di Eropa dan kurang lebih 175.000 di Amerika Serikat. Di Indonesia jumlah kanker payudara menduduki tingkat ke dua setelah kanker mulut rahim (3).

Insiden kanker yaitu banyaknya kasus kanker baru per 100.000 penduduk dalam satu wilayah tertentu, umumnya dalam waktu tertentu. WHO memperkirakan insiden kanker di Indonesia ialah 180 per 100.000 penduduk (1).

II.1.2 Penyebab Kanker Payudara

Sampai saat ini belum diketahui secara pasti apa yang menyebabkan kanker ini terjadi, namun beberapa faktor kemungkinannya adalah (9,10) :

1. Usia

Penyakit kanker payudara lebih sering terjadi pada perempuan berusia di atas 50 tahun.

2. Genetik.

Ada 2 jenis gen (BRCA1 dan BRCA2) yang sangat mungkin sebagai risiko. Jika ibu atau saudara wanita mengidap penyakit kanker

payudara, maka kemungkinan orang tersebut memiliki risiko kanker payudara 2 kali lipat dibandingkan wanita lain yang dalam keluarganya tidak ada penderita kanker payudara.

3. Gangguan keseimbangan hormonal

Hormon estrogen berfungsi merangsang pertumbuhan sel yang cenderung mendorong terjadinya kanker, sedangkan progesteron melindungi terjadinya pertumbuhan sel yang berlebihan. Ada kecenderungan bahwa kelebihan hormon estrogen dan kekurangan progesteron menyebabkan meningkatnya risiko kanker payudara.

4. Riwayat kesehatan reproduksi

Perempuan yang melahirkan anak di bawah usia 30 tahun mempunyai risiko lebih rendah mengalami kanker payudara dibandingkan perempuan yang melahirkan anak setelah 30 tahun atau tidak memiliki anak sama sekali.

II.1.3 Patogenesis Kanker

Tubuh disusun oleh ratusan juta sel hidup. Sel tubuh yang normal, tumbuh, membelah, dan mati secara sistematis. Pembelahan sel adalah proses yang berlangsung secara terus menerus, namun kecepatan dari pembelahan berubah-ubah, tidak hanya tergantung pada usia tapi juga tergantung pada jenis sel dan dimana letak sel itu di dalam tubuh (9,11).

Sebagian besar sel diprogram untuk melakukan pembelahan sampai beberapa kali dan kemudian akan berhenti karena di stop oleh sebuah mekanisme yang ada dalam sel itu sendiri, yang disebut sebagai

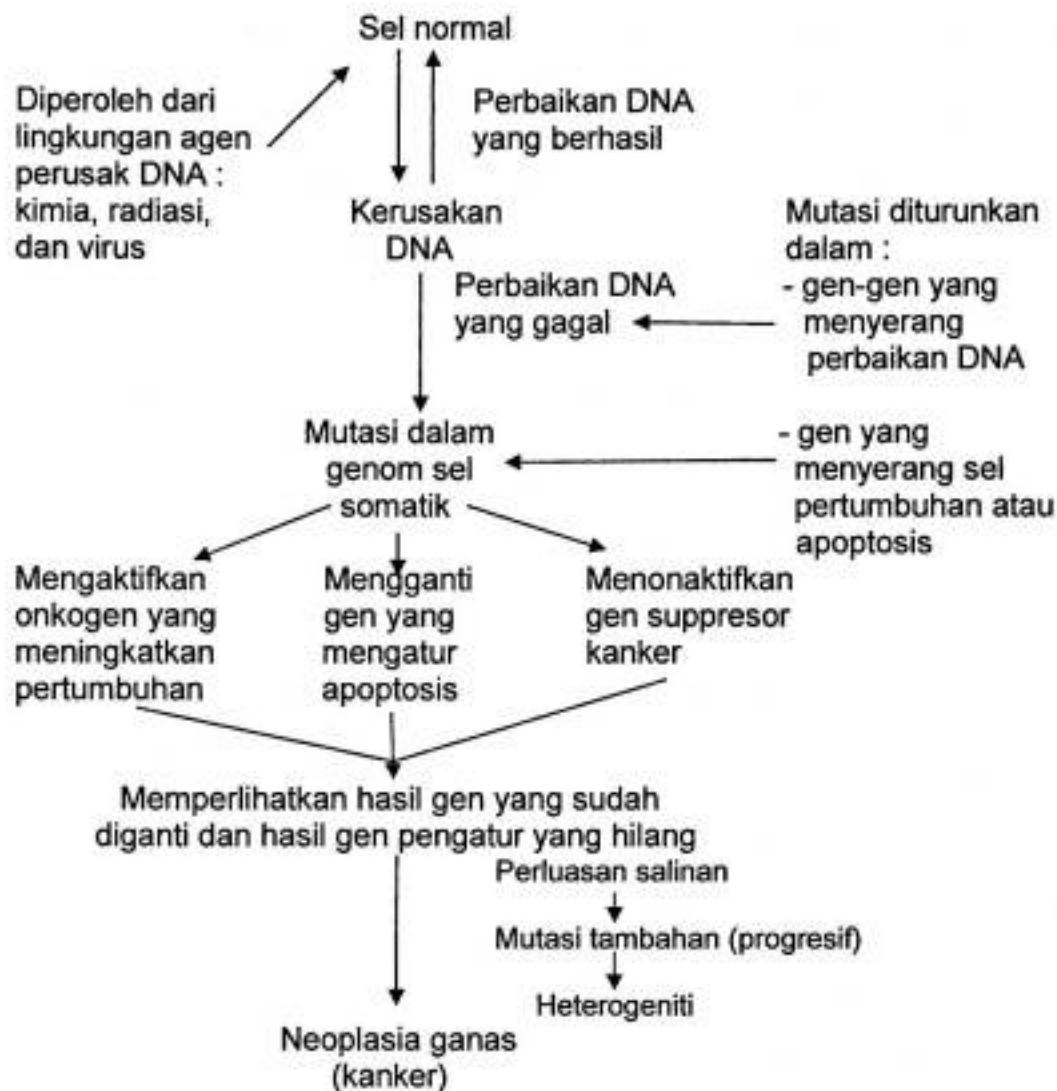
apoptosis. Proses pembelahan sel secara terus menerus ini berguna memastikan bahwa akan selalu ada sel-sel muda yang melakukan fungsi-fungsi dari organ dan ini semuanya dikendalikan oleh DNA, yaitu materi yang membentuk gen (11).

Gen adalah unit molekul DNA atau RNA yang membawa informasi mengenai urutan asam amino yang lengkap. Secara umum di dalam setiap makhluk hidup, baik prokariotik maupun eukariotik, ada dua macam sistem pengaktifan ekspresi gen, yaitu ekspresi gen secara konstitutif dan ekspresi gen secara induktif. Gen-gen yang diekspresikan secara konstitutif praktis selalu diekspresikan dalam keadaan apapun. Sebaliknya, ekspresi gen secara induktif yaitu kelompok gen yang hanya diekspresikan jika ada keadaan yang memungkinkan atau ada proses induksi. Masing-masing gen mengandung informasi yang dibutuhkan untuk membuat protein dan *noncoding* RNA. Oleh karena itu, gen harus diekspresikan untuk memproduksi molekul-molekul protein dan RNA fungsional di dalam sel. Ekspresi gen melibatkan dua kegiatan utama, yaitu proses transkripsi dan translasi. Transkripsi yaitu proses perubahan DNA menjadi mRNA yang berlangsung di dalam inti sel. Sedangkan translasi yaitu proses perubahan mRNA menjadi protein yang berlangsung di ribosom (12,13).

Adakalanya siklus sel terhenti karena berbagai macam sebab sehingga setelah bertumbuh sel tidak mengalami pembelahan tetapi mengalami perubahan degenerasi dan kemudian mati. Apabila dalam 1

jaringan tubuh terdapat sel-sel yang mati, umumnya sel-sel ini akan diganti oleh sel-sel baru yang dihasilkan dari pembelahan sel-sel pada jaringan yang sama sehingga fungsi jaringan tidak terganggu. Akan tetapi kemampuan regenerasi jaringan tidak selalu sama pada tiap jaringan, ada jaringan yang mudah mengadakan regenerasi ada pula yang sukar (14).

Kanker terjadi pada satu sel tertentu ketika terjadi penyimpangan dari pola perilaku sel yang normal. Kanker terjadi sebagai akibat dari mutasi yang terjadi pada DNA atau pada gen-gen dari sel-sel tertentu. Mutasi ini terjadi secara terus menerus sehingga sel tidak lagi berfungsi secara normal karena proses perlindungan dan perbaikan yang sangat penting fungsinya dalam sel-sel itu, yaitu proses-proses yang mengendalikan kegiatan sel dan mengendalikan apoptosis itu sendiri, menjadi kacau. Akibatnya sel tidak mati seperti yang seharusnya dan justru terus melakukan pembelahan diri secara terus menerus, yang seringkali terjadi dengan kecepatan tinggi, sehingga menghasilkan kanker. Ini bisa terjadi dengan sangat cepat sehingga mengalahkan pembelahan sel yang terjadi pada sel-sel normal dan membuat sel-sel normal menjadi sangat sedikit atau terdesak karena tidak mendapatkan ruang. Ini bisa menimbulkan gangguan pada fungsi dari jaringan atau organ yang mengalami kanker. Dalam banyak jenis kanker, perubahan tersebut membuat sel kanker bisa mengalami metastasis atau penyebaran ke bagian tubuh yang lain melalui aliran darah atau aliran limfe (11).



Gambar 1. Skema proses terjadinya kanker (Sumber: Price SA, Wilson LM. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ed. 6. Terjemahan oleh Brahm U. pendit, Huriawati Hartono, Pita Wulansari, dan Dewi Asih Mahanani. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 2006. hal. 151)

Bila ada kerusakan gen, tubuh berusaha memperbaiki transkripsi gen yang rusak tersebut. Transkripsi yaitu proses perubahan DNA menjadi mRNA yang berlangsung di dalam inti sel. Kerusakan transkripsi dapat diperbaiki dengan adanya gen perbaikan DNA. Gen perbaikan DNA adalah gen yang mengatur mekanisme yang digunakan sel untuk

memperbaiki kerusakan yang terjadi pada DNA. Kerusakan pada DNA ini bisa terjadi karena mutasi, karena kesalahan dalam penyalinan atau penggandaan DNA, atau kesalahan di dalam sintesa DNA. Kerusakan DNA itu bisa juga disebabkan oleh adanya gangguan dari luar seperti ketika orang yang bersangkutan terkena radiasi atau tubuhnya kemasukan bahan yang aktif secara metabolis. Ada dua jenis mekanisme yang terjadi dalam proses perbaikan DNA, yaitu NER (Nucleotida Excision Repair) dan perbaikan terhadap kesalahan dalam pemasangan. Mekanisme NER digunakan untuk mengenali dan memperbaiki bagian-bagian dalam DNA yang mengalami kerusakan. Sementara perbaikan terhadap kesalahan pemasangan adalah lapis pertahanan kedua yang digunakan untuk memperbaiki DNA-DNA yang rusak tapi lolos dari mekanisme NER tadi. Bila transkripsi gen itu dapat diperbaiki dengan sempurna, maka pada replikasi sel berikutnya terbentuklah sel baru yang normal. Tetapi bila tidak dapat diperbaiki dengan sempurna maka akan terbentuk sel baru yang abnormal, yaitu sel yang mengalami mutasi, atau transformasi, yang lama kelamaan dapat menjadi sel kanker (11,15).

II.1.4 Penyebaran Kanker

Kanker payudara sering timbul pada kelenjar susu dari jaringan payudara. Penyebaran kanker payudara terjadi dengan invasi langsung ke parenkim payudara sepanjang duktus mamaria, pada kulit permukaan, dan meluas melalui jaringan limfatik payudara (8). Proses penyebaran (metastases) terjadi karena ada interaksi antara sel kanker dengan sel

tubuh normal penderita. Sel-sel tubuh mempunyai daya tahan, baik mekanis maupun imunologis, sedangkan sel kanker mempunyai daya untuk mengadakan invasi, mobilisasi, dan metastasis (1).

Kanker payudara berdasarkan serangannya terbagi menjadi 2 (2) :

1. Kanker payudara invasif

Sel kanker merusak saluran dan dinding kelenjar susu serta menyerang lemak dan jaringan konektif payudara di sekitarnya. Kanker dapat bersifat invasif (menyerang) tanpa selalu menyebar (bermetastasis) nodus limfe atau ke organ lain dalam tubuh.

2. Kanker payudara noninvasif

Sel kanker berada pada saluran susu dan tidak menyerang lemak dan jaringan konektif payudara di sekitarnya.

Pada proses metastases, sel kanker menginvasi dan masuk ke dalam pembuluh darah dan akan (1) :

1. Terhenti pada suatu tempat dan menempel pada endothel pembuluh darah.
2. Sel kanker merusak membran basal dan matriks pembuluh darah. Setelah melekat pada endothelial membran sel basal, sel kanker tersebut akan mengeluarkan enzim seperti protease yang dapat merusak membran basal sehingga sel kanker dapat ke luar dari pembuluh darah.
3. Sel kanker migrasi ke jaringan ekstravaskuler.
4. Sel kanker merangsang pertumbuhan pembuluh darah baru.

II.2 Imunitas Tubuh

Ketika kekebalan tubuh manusia kuat, sel-sel kanker akan rusak dan dicegah dari pembiakan dan pembentukan kanker (2). Karena itu sistem imun yang normal harus mampu mengenali sel-sel abnormal tersebut dan memusnahkannya. Bila antigen masuk ke dalam tubuh, tubuh akan mengaktifkan sistem imun untuk melawan antigen tersebut. Di dalam inti sel gen yang menyandi sistem imun akan merangsang proses transkripsi dengan mengubah DNA menjadi mRNA dan dikeluarkan ke sitoplasma menuju ribosom. mRNA yang membawa kode genetik untuk sistem imun akan mengalami proses translasi yang mengubah mRNA menjadi protein. Protein yang dihasilkan akan bekerja sebagai sistem imun untuk melawan antigen tersebut. Fungsi sistem imun merupakan fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal tersebut sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya jika tumor itu sudah tumbuh (6,15,16).

Sel kanker dikenal oleh tubuh sebagai bahan asing, sehingga mekanisme imunologi tubuh akan bereaksi secara humoral maupun seluler. Tubuh mempunyai kemampuan immunosurveillance, yaitu suatu mekanisme yang digunakan oleh tubuh untuk bereaksi melawan setiap antigen yang diekspresikan oleh semua sel kanker maupun sel yang bermutasi untuk mencegah perkembangan sel kanker tersebut, namun terkadang terjadi immunological escape yaitu sel kanker luput dari pengawasan sistem imun, sehingga terjadilah kanker (3, 4).



II.2.1 Monosit/Makrofag

Fagosit mononuklear terdiri dari monosit dan makrofag. Sel-sel monosit yang diproduksi dalam sumsum tulang akan masuk ke dalam pembuluh darah. Setelah 24 jam, sel monosit akan bermigrasi dari peredaran darah ke tempat tujuan di berbagai jaringan untuk berdiferensiasi sebagai makrofag. Sel kupffer adalah makrofag dalam hati, histiosit dalam jaringan ikat, makrofag alveolar di paru, sel glia di otak, dan sel langerhans di kulit (5).

Salah satu sistem imun yang berperan dalam melawan sel kanker yaitu makrofag. Makrofag merupakan fagosit mononuklear yang berperan pada sistem imun nonspesifik. Makrofag berperan sebagai Antigen Presenting Cell (APC) dan apabila diaktifkan maka akan mempunyai kemampuan untuk mengenal atau membedakan sel-sel tumor dari sel-sel normal. Selain itu, teraktifasinya makrofag juga akan mengeluarkan *Tumor Necrosis Factor α* (TNF- α) yang secara langsung akan membunuh sel kanker (5,17).

II.2.2 Sitokin

Sitokin yaitu protein yang diproduksi oleh banyak jenis sel yang berperan dalam inflamasi dan reaksi imun. Sitokin merupakan protein sistem imun yang mengatur interaksi antar sel dan memacu reaktifitas imun, baik pada imunitas nonspesifik maupun sistem imun spesifik. Aktivitas sitokin dapat lokal maupun sistemik. Sebagian besar sitokin beraksi dekat dengan tempatnya diproduksi, baik dalam sel yang

memproduksinya (autocrine action), maupun pada sel yang letaknya berdekatan (paracrine action). Bila diproduksi dalam jumlah banyak, sitokin dapat masuk dalam sirkulasi dan bekerja secara sistemik (endocrine action) (5,6).

TNF- α merupakan salah satu produk dari sitokin yang berfungsi untuk menghancurkan sel-sel tumor dan menghambat penyebaran sel kanker. TNF- α terdapat pada semua jenis sel mamalia. Dinamakan TNF- α karena kemampuannya dalam menghancurkan tumor. Pada penderita kanker dengan berbagai macam tipe kanker terdapat sirkulasi TNF- α yang sangat tinggi. Selain itu, sirkulasi TNF- α yang sangat tinggi telah dikorelasikan dengan stadium tumor, tingkat komplikasi, dan waktu bertahan hidup yang singkat pada penderita kanker (18,19).

TNF- α diproduksi oleh berbagai jenis sel termasuk makrofag, sel T, sel B, sel NK, dan sel kupfer. Inflamasi yang berat dapat memicu produksi TNF- α dalam jumlah besar yang akan menimbulkan reaksi sistemik (5). TNF- α bersama-sama dengan IFN- γ bersifat sitotoksik bagi banyak jenis sel tumor. TNF- α berefek antitumor dan melalui efek sitotoksik sel makrofag dapat mematikan sel tumor atau menghambat proliferasinya, sehingga menyebabkan nekrosis tumor. Selain itu TNF- α juga dapat memutus aliran darah tumor, memacu reaksi inflamasi hospes, stimulasi produksi antibodi sitotoksik spesifik tumor (6,16).

II.3. Teknik PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah salah satu teknik biologi molekuler untuk memperbanyak jumlah DNA secara in-vitro dengan menggunakan enzim polymerase dan perubahan temperatur. Teknik PCR ini merupakan cara yang sangat sensitif dan spesifik dalam menentukan urutan DNA sel dan banyak digunakan sebagai alternatif dalam menegakkan diagnosa penyakit yang disebabkan oleh bakteri, virus, dan parasit lain. Selain itu teknik PCR ini digunakan secara luas dalam menentukan urutan DNA yang mengekspresikan sifat-sifat keturunan dan penyakit yang berhubungan dengan kelainan genetik (7,20).

Tujuan utama dari teknik ini adalah untuk memperbaiki sensitivitas uji yang berdasar pada asam nukleat dan untuk menyederhanakan prosedur kerjanya melalui otomatisasi dan bentuk deteksi non isotopik. Teknik amplifikasi in vitro sangat beragam dan secara konstan mengalami transisi, oleh karena itu perlu klasifikasi untuk memudahkan pemahaman teknik ini dan agar cukup fleksibel bila ada perubahan (20).

Teknik ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan *CETUS Corporation*. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA. Teknik PCR sangat sensitif. Sensitivitas tersebut membuatnya dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA, memisahkan

gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom serta dapat diperoleh pelipatgandaan suatu fragmen DNA sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit (Mullis dan Faloona, 1989), hal ini menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat (21).

Selain itu, PCR juga untuk menganalisa mRNA, tetapi karena RNA tidak dapat digunakan sebagai template untuk membuat kopi, terlebih dahulu perlu dilakukan transkripsi balik (*reverse transcriptase*) terhadap molekul mRNA sehingga diperoleh molekul cDNA (*complementary DNA*) dari mRNA yang bersangkutan. Molekul cDNA tersebut kemudian digunakan sebagai cetakan dalam proses PCR. Setelah itu dilakukan amplifikasi PCR. Gabungan kedua teknik tersebut disebut *Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)* (6,21).

II.3.1. Ekstraksi RNA

Dalam teknik PCR ini untuk mendapatkan DNA atau RNA dari sampel perlu dilakukan ekstraksi terlebih dahulu. Ekstraksi dapat dilakukan dengan metode boom. Kelebihan dari metode boom yaitu: (7,22)

1. Dapat dilakukan ekstraksi dan pemurnian baik DNA maupun RNA dari sampel yang akan dianalisa.
2. sampel yang digunakan dapat dalam jumlah yang kecil dan membutuhkan waktu ekstraksi yang tidak lama.

Pada tahap awal dari ekstraksi RNA yaitu melisiskan sel target dengan menggunakan buffer L6 yang berisi yang berisi GuSCN, Tris HCl

pH 6,4, dan Triton X-100. Buffer L6 berfungsi untuk melisiskan dinding sel sehingga RNA yang terdapat di dalam sampel akan keluar. Setelah sel target lisis, mRNA akan bergabung dengan partikel silika atau diatom yang bersifat berpori-pori. Pada konsentrasi GuSCN yang meningkat, DNA maupun RNA akan berikatan secara spesifik dengan partikel silika. Pada prosedur ini, pencucian dilakukan dengan menggunakan buffer L2, etanol, dan aseton. L2 yang mengandung GuSCN, dan tris HCl pH 6,4 berfungsi untuk menghilangkan Triton X-100 pada buffer L6. Etanol berfungsi untuk menghilangkan guanidium pada buffer L6 dan buffer L2 dan aseton berfungsi untuk menguapkan zat cair yang ada pada diatom. Tahap terakhir dari proses ekstraksi yaitu penambahan destilat water untuk membentuk suspensi RNA yang selanjutnya hasil ekstraksi sudah dapat digunakan untuk amplifikasi dengan RT-PCR (22,23,24).

II.3.2. Amplifikasi dengan teknik RT-PCR.

Pada tahap awal amplifikasi, RNA yang telah diekstraksi ditambahkan PCR mix. PCR mix merupakan campuran yang terdiri atas enzim reverse transkriptase, dNTPs (deoxynucleotida triphosphates) enzim Tag polymerase, primer, larutan buffer, dan aquadest steril. Prinsip dasar dari amplifikasi dengan menggunakan teknik RT-PCR yaitu terjadinya proses transkripsi balik dari molekul mRNA menjadi cDNA (complementary DNA) yang melibatkan enzim reverse transkriptase dan dNTPs. dNTPs merupakan bahan pembangun molekul asam nukleat yang terdiri atas dATP (deoxyadenosine triphosphates), dTTP (deoxythymidine

triphosphates), dGTP (deoxyguanosine triphosphates), dan dCTP (deoxycytosine triphosphates) (7,22,25).

Salah satu tahapan dari PCR adalah denaturasi dengan menggunakan suhu tinggi yaitu 95°C maka diperlukan suatu enzim DNA polymerase yang tetap aktif meskipun mengalami inkubasi pada suhu tinggi. Salah satu enzim DNA polymerase yang biasa digunakan yaitu Taq DNA polymerase. Kelebihan enzim Taq DNA polymerase yaitu enzim ini tahan terhadap suhu tinggi yang diperlukan untuk memisahkan rantai DNA. Dengan kelebihan semacam ini tidak diperlukan penambahan enzim pada tiap-tiap siklus pada PCR (21).

Setelah pemisahan DNA menjadi untai tunggal, selanjutnya tahap annealing yaitu pengikatan primer dengan untai-DNA yang sesuai pada suhu 56°C. Dengan menggunakan primer yang tepat maka dengan sendirinya primer tersebut akan bergabung dengan salah satu untai tunggal DNA. Primer yang digunakan mempunyai panjang 21 pasangan basa (bp) dan merupakan susunan dari oligonukleotida yang disintesa. Primer ini digunakan secara berpasangan dimana primer yang pertama sering disebut "forward primer" sedangkan primer yang kedua sering disebut sebagai "reverse primer". Selanjutnya tahap elongating yaitu perpanjangan ikatan antara primer dengan untai DNA yang telah terikat, pada suhu 72°C. Proses selanjutnya diulangi sebanyak 40 siklus, sehingga akan diperoleh DNA yang spesifik dalam jumlah secara eksponensial (7,21,23).

II.3.3. Elektroforesis

Elektroforesis DNA merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Molekul akan bergerak pada suatu medan listrik, kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran (23).

Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (anode). Makin besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya (23).

Berat molekul suatu fragmen DNA dapat diperkirakan dengan membandingkan laju migrasinya dengan laju migrasi fragmen-fragmen molekul DNA standar (DNA marker) yang telah diketahui ukurannya. Visualisasi DNA selanjutnya dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan larutan etidium bromida. Hasil elektroforesis akan tampak berupa pita atau band yang berpendar. Pengukuran ini merupakan pengukuran secara semikuantitatif sehingga yang menjadi ukuran adalah intensitas dari band DNA yang terbentuk. Semakin tinggi intensitasnya menunjukkan semakin tinggi gen yang diekspresikan (23).

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara deskriptif dengan menggunakan uji PCR untuk melihat adanya ekspresi gen TNF- α yang terdapat pada jaringan kanker dan darah orang normal.

III.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan November 2009 dan dilakukan pada dua tempat, yaitu :

1. Rumah Sakit dr. Wahidin Sudirohusodo di Makassar untuk pengambilan sampel yang berasal dari penderita kanker payudara.
2. Laboratorium Biologi Molekuler Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar untuk uji PCR.

III.3 Subjek dan Cara Pemilihan Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah semua populasi terjangkau yang memenuhi kriteria subjek penelitian dan dipilih sesuai dengan urutan sampel yang masuk ke laboratorium Biologi Molekuler Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

III.4 Kriteria Sampel

Kriteria sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu :
Penderita yang telah didiagnosa menderita kanker payudara.

III.5 Jenis Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan kanker dan darah vena orang sehat yang telah setuju untuk diikuti dalam penelitian ini, sebanyak 10 sampel dengan teknik pengambilan sampel berdasarkan kejadian atau kemunculannya dan pada saat itu juga.

III.6 Definisi Operasional

Berbagai istilah yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Kanker payudara adalah tumor pada payudara yang telah didiagnosa oleh dokter ahli bedah onkologi.
2. TNF- α yang dilihat ekspresinya adalah produk amplifikasi DNA dengan metode RT-PCR (Reverse Transkripsi PCR) yang dilihat dalam bentuk band/pita.
3. PCR adalah teknik amplifikasi/penggandaan fragmen DNA dengan menggunakan enzim Polimerase dan primer DNA.

III.7 Alat dan Bahan Penelitian

III.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan yaitu alat elektroforesis, alat gel doc, mesin PCR, *gyrotary shaker*, inkubator, pipet 1000 ul, 100 ul, dan 10 ul, sentrifus, vortex, dan *waterbath*.

III.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel jaringan kanker payudara, sampel darah vena orang sehat, buffer L6, suspensi

diatom, buffer L2, etanol 70%, aseton, destilat water, PCR mix, ethidium bromida, gel agarose 2%, *mikrocup*, tabung eppendorf, primer yang terdiri atas:

1. TNF- α : 5'-CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT-3' dan 5'-GCCAGAGGGC TGATTAGAGA-3'
2. β -actin : 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' dan 5'-CTCCTTAATG TCACGCACGATTTTC-3'.

III.8 Prosedur Kerja

III.8.1 Pengambilan sampel

Sampel berupa jaringan kanker payudara dan darah vena dari orang sehat, masing-masing dimasukkan pada *mikrocup* yang berisi larutan buffer L6.

III.8.2 Pemeriksaan PCR

a. Ekstraksi RNA TNF- α yang berasal dari jaringan kanker payudara dengan metode Boom.

Sebanyak 1 irisan sampel jaringan kanker dari penderita kanker payudara dimasukkan ke dalam *mikrocup* lalu ditambahkan 900 μ l larutan L6 dan dihomogenkan pada *gyrotary shaker*. Campuran disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, lalu ditambah 20 μ l suspensi diatom kemudian dilakukan vortex dan disentrifuse di dalam tabung eppendorf dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan dipisahkan dan dicuci dengan larutan L2. Selanjutnya pencucian dilakukan sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan L2

dan dilanjutkan dengan etanol 70% sebanyak 2 kali dan aseton 1 kali. Setelah itu dipanaskan dalam suhu 56°C pada *waterbath* selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl destilat water kemudian dilakukan vortex. Tabung eppendorf tersebut diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 10 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf yang baru. Supernatan dari proses ini merupakan hasil ekstraksi yang mengandung RNA dan disimpan pada suhu -20°C untuk dilakukan analisa PCR.

b. Ekstraksi RNA yang berasal dari darah vena orang sehat dengan metode Boom.

Sebanyak 100µl sampel darah vena orang sehat dimasukkan ke dalam *mikrocup* lalu ditambahkan 900 µl larutan L6 dan dihomogenkan pada *gyrotary shaker*. Campuran disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit, lalu ditambah 20 µl suspensi diatom kemudian dilakukan vortex dan disentrifuse di dalam tabung eppendorf dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan dipisahkan dan dicuci dengan larutan L2. Selanjutnya pencucian dilakukan sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan L2 dan dilanjutkan dengan etanol 70% sebanyak 2 kali dan aseton 1 kali. Setelah itu dipanaskan dalam suhu 56°C pada *waterbath* selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl destilat water kemudian dilakukan vortex. Tabung eppendorf tersebut diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 10 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 30 detik dan dipindahkan ke dalam tabung

eppendorf yang baru. Supernatan dari proses ini merupakan hasil ekstraksi yang mengandung RNA dan disimpan pada suhu -20°C untuk dilakukan analisa PCR.

c. Amplifikasi RNA TNF- α dengan teknik RT-PCR.

Hasil ekstraksi RNA sebanyak 2,5 μl ditambah 22,5 μl PCR mix dan dimasukkan ke dalam tabung 250 μl . Tabung dimasukkan dalam mesin PCR. Program amplifikasi dibuat dan berlangsung sampai 40 siklus, yang tiap siklus terdiri dari :

1. Denaturasi dengan jalan pemisahan dari pasangan untai-DNA, pada suhu 95°C selama 30 detik.
2. Annealing yaitu pengikatan primer dengan untai-DNA yang sesuai pada suhu 56°C selama 30 detik.
3. Elongating yaitu perpanjangan ikatan antara primer dengan untai DNA yang telah terikat, pada suhu 72°C selama 30 detik.

Hasil PCR kemudian dianalisa dengan menggunakan metode elektroforesis.

d. Analisa hasil PCR dengan metode elektroforesis menggunakan 2% gel agarose.

Kedalam tangki elektroforesis, dimasukkan produk amplifikasi yang ditambahkan larutan loading (ethidium bromide) sebanyak 2 μl lalu dimasukkan ke dalam sisir sumur-sumur yang telah berisi 2 % gel agarose. Elektroforesis dijalankan dengan electrode 220 volt sehingga DNA akan bergerak ke kutub positif. Hasil elektroforesis dapat dilihat

dengan bantuan lampu ultraviolet, pita DNA dapat divisualisasikan dengan kamera. Pita DNA dari sampel dibandingkan dengan pita internal control β -actin. Bila terletak pada jumlah basa (*bp*) yang sama sebanyak 123 *bp* maka sampel yang di tes adalah TNF- α .

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Pada tabel 1 menunjukkan hasil pemeriksaan dari sampel jaringan kanker payudara dengan jumlah sampel sebanyak 10 sampel.

Tabel 1. Hasil penelitian sampel jaringan kanker payudara

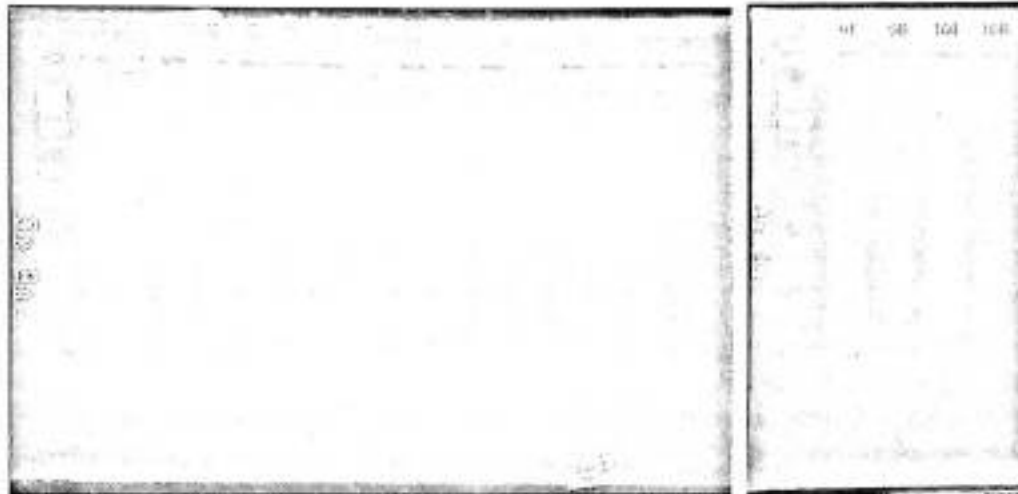
No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur	Ekspresi gen TNF- α
1	MG	F	52	+3
2	AN	F	41	+3
3	ED	F	58	+4
4	RS	F	51	+4
5	SL	F	49	+4
6	CT	F	56	+5
7	SH	F	44	+5
8	FT	F	49	+4
9	RM	F	44	+3
10	AB	F	60	+3

Pada tabel 2 memperlihatkan data dari ekspresi gen TNF- α pada sampel jaringan kanker payudara dimana nilai +3 sebanyak 4 orang, +4 sebanyak 4 orang, dan +5 sebanyak 2 orang.

Tabel 2. Data ekspresi gen TNF- α pada sampel jaringan kanker payudara

No.	RNA TNF- α (x_i)	Frekuensi (f_i)
1.	+1	0
2.	+2	0
3.	+3	4
4.	+4	4
5.	+5	2
		$\Sigma f_i = 10$

Berdasarkan data tersebut, dilakukan perhitungan mean ekspresi gen TNF- α dari masing-masing sampel penderita kanker payudara. Mean dari sampel penderita kanker payudara yaitu 3,8 (lihat lampiran VII).



Gambar 2. Hasil pemeriksaan PCR pada sampel jaringan kanker payudara

Gambar 2 menunjukkan hasil PCR pada sampel jaringan kanker payudara. Pada sampel 3, 4, 5, 6, 7, dan 8, pita DNA yang terbentuk lebih tebal dibandingkan sampel 1, 2, 9, dan 10.

Pada tabel 3 menunjukkan hasil pemeriksaan dari sampel darah vena orang sehat dengan jumlah sampel sebanyak 10 sampel.

Tabel 3. Hasil penelitian sampel darah vena orang sehat

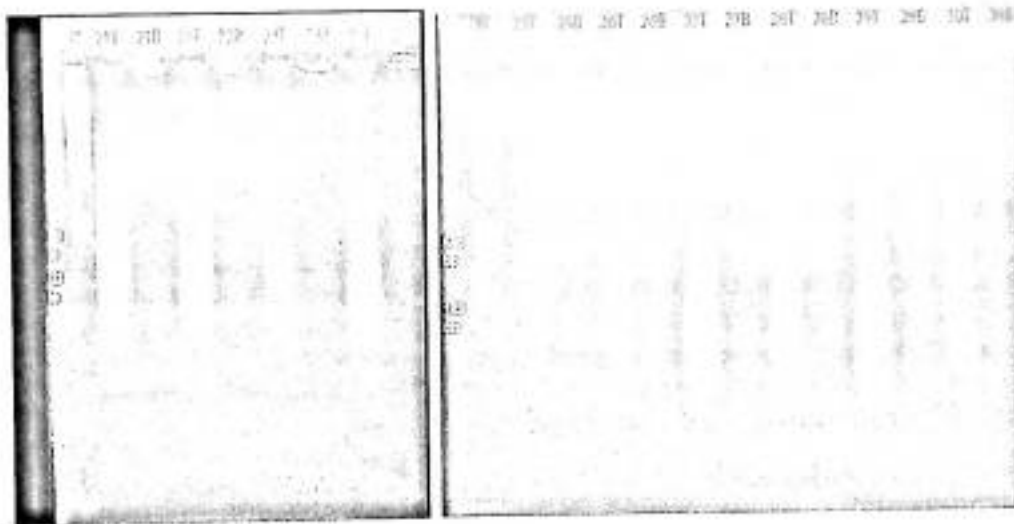
No.	Nama	Jenis Kelamin	Umur	Ekspresi Gen TNF- α
1	RL	F	47	+2
2	EN	F	45	+2
3	KM	F	53	+1
4	CL	F	45	+2
5	JH	F	58	+1
6	KH	F	51	+1
7	BH	F	44	+5
8	ID	F	58	+2
9	LB	F	47	+5
10	MP	F	53	+2

Pada tabel 4 memperlihatkan data dari ekspresi gen TNF- α pada sampel jaringan kanker payudara dimana nilai +1 sebanyak 3 orang, +2 sebanyak 5 orang, dan +5 sebanyak 2 orang.

Tabel 4. Data ekspresi gen TNF- α pada sampel darah orang sehat

No.	RNA TNF- α (x_i)	Frekuensi (f_i)
1.	+1	3
2.	+2	5
3.	+3	0
4.	+4	0
5.	+5	2
		$\Sigma f_i = 10$

Berdasarkan data tersebut, dilakukan perhitungan mean ekspresi gen TNF- α dari masing-masing sampel darah orang sehat. Mean dari sampel darah orang sehat, yaitu 2,3 (lihat lampiran VII).



Gambar 3. Hasil PCR sampel darah vena orang sehat

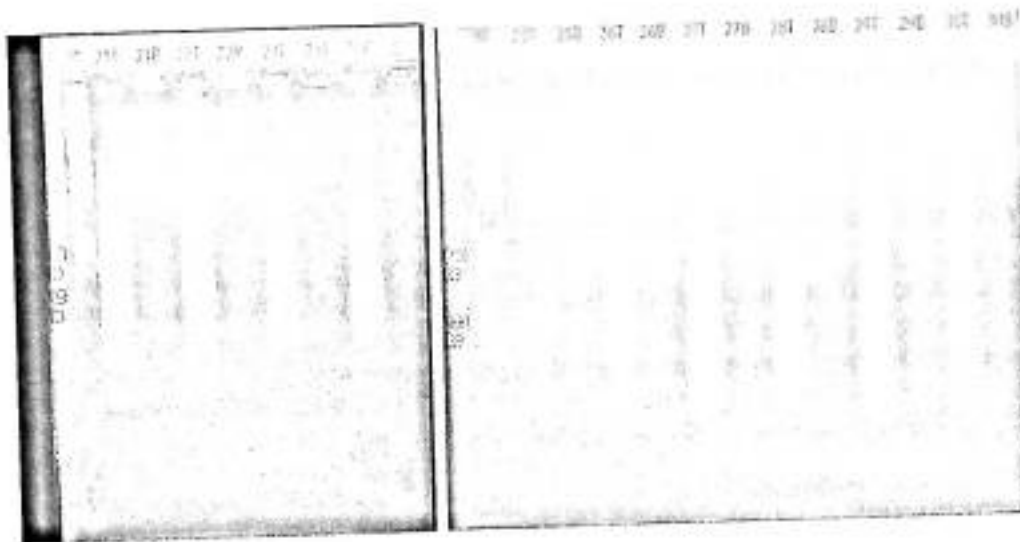
Gambar 3 menunjukkan hasil PCR pada sampel darah vena orang sehat. Pada sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 dan 10 pita DNA yang terbentuk lebih tipis dibandingkan sampel 7 dan 9.

Pada tabel 4 memperlihatkan data dari ekspresi gen TNF- α pada sampel jaringan kanker payudara dimana nilai +1 sebanyak 3 orang, +2 sebanyak 5 orang, dan +5 sebanyak 2 orang.

Tabel 4. Data ekspresi gen TNF- α pada sampel darah orang sehat

No.	RNA TNF- α (x_i)	Frekuensi (f_i)
1.	+1	3
2.	+2	5
3.	+3	0
4.	+4	0
5.	+5	2
		$\Sigma f_i = 10$

Berdasarkan data tersebut, dilakukan perhitungan mean ekspresi gen TNF- α dari masing-masing sampel darah orang sehat. Mean dari sampel darah orang sehat, yaitu 2,3 (lihat lampiran VII).



Gambar 3. Hasil PCR sampel darah vena orang sehat

Gambar 3 menunjukkan hasil PCR pada sampel darah vena orang sehat. Pada sampel 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 dan 10 pita DNA yang terbentuk lebih tipis dibandingkan sampel 7 dan 9.

IV.2 Pembahasan

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2009 sampai Januari 2010 untuk mendeteksi ekspresi gen TNF- α dari kanker payudara dengan menggunakan teknik *Reverse Transkriptase PCR* (RT-PCR). Pada penelitian ini digunakan teknik RT-PCR karena yang akan dideteksi adalah mRNA dari gen TNF- α , untuk melihat bagaimana TNF- α tersebut diekspresikan atau dihasilkan sebagai sistem imun pada saat terjadi kanker (24).

Pada pemeriksaan PCR digunakan internal kontrol β -actin untuk melihat kualitas pemeriksaan dari PCR. β -actin merupakan housekeeping gene yang diekspresikan oleh semua jenis sel. Housekeeping gene digunakan sebagai standar internal dalam PCR karena umumnya ekspresi dari housekeeping gene tidak dipengaruhi oleh kondisi eksperimental dan selalu hadir dalam kondisi apapun (25).

Pada penelitian sampel yang digunakan hanya berasal dari wilayah Makassar untuk mengurangi nilai bias dari sampel karena faktor keturunan merupakan salah satu penyebab terjadinya kanker payudara. Ketika seorang individu memiliki gen yang rusak, maka akan memiliki kemungkinan besar untuk menimbulkan kanker, dimana gen yang rusak tersebut diwariskan secara genetik dari orang tuanya. Faktor genetik menyebabkan beberapa keluarga memiliki resiko lebih tinggi untuk menderita kanker tertentu bila dibandingkan dengan keluarga lainnya (11).

Penelitian ini menggunakan sampel dari jaringan kanker payudara dan sampel dari darah orang sehat pada perempuan yang berumur diatas 40 tahun. Hal ini karena perempuan paling sering menderita kanker payudara dibandingkan laki-laki. Sebab utama dari kanker payudara pada perempuan diperkirakan karena perempuan lebih banyak memproduksi hormon estrogen dibandingkan laki-laki (8). Hormon estrogen berfungsi merangsang pertumbuhan sel yang cenderung mendorong terjadinya kanker, sedangkan progesteron melindungi terjadinya pertumbuhan sel yang berlebihan. Ada kecenderungan bahwa kelebihan hormon estrogen dan kekurangan progesteron menyebabkan meningkatnya risiko kanker payudara (2).

Pada penelitian digunakan sampel darah vena dari orang sehat karena TNF- α diproduksi pula oleh monosit. Monosit merupakan nama lain dari makrofag di dalam darah. Sesuai dengan teori bahwa sel-sel monosit yang diproduksi dalam sumsum tulang akan masuk ke dalam pembuluh darah. Setelah 24 jam, sel monosit akan bermigrasi dari peredaran darah ke tempat tujuan di berbagai jaringan untuk berdiferensiasi sebagai makrofag (5). Sehingga TNF- α dapat ditemukan di jaringan, yang diproduksi oleh makrofag, dan terdapat pula di dalam darah, yang diproduksi oleh monosit.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa pada penderita kanker payudara terjadi peningkatan ekspresi dari gen TNF- α dibandingkan dengan orang sehat. Hal ini sesuai dengan teori yaitu

inflamasi yang berat memicu produksi TNF- α dalam jumlah besar (5). Teraktifasinya makrofag akan mengeluarkan TNF- α yang secara langsung membunuh sel kanker, sehingga lebih banyak ditemukan TNF- α pada jaringan kanker dibandingkan pada darah orang sehat (16). Tetapi pada sampel 7 dan 9 terjadi peningkatan dari ekspresi gen TNF- α yang berada pada level +5, hal ini kemungkinan gen TNF- α telah terekspresikan di dalam tubuh tetapi belum menunjukkan gejala.

DAFTAR PUSTAKA

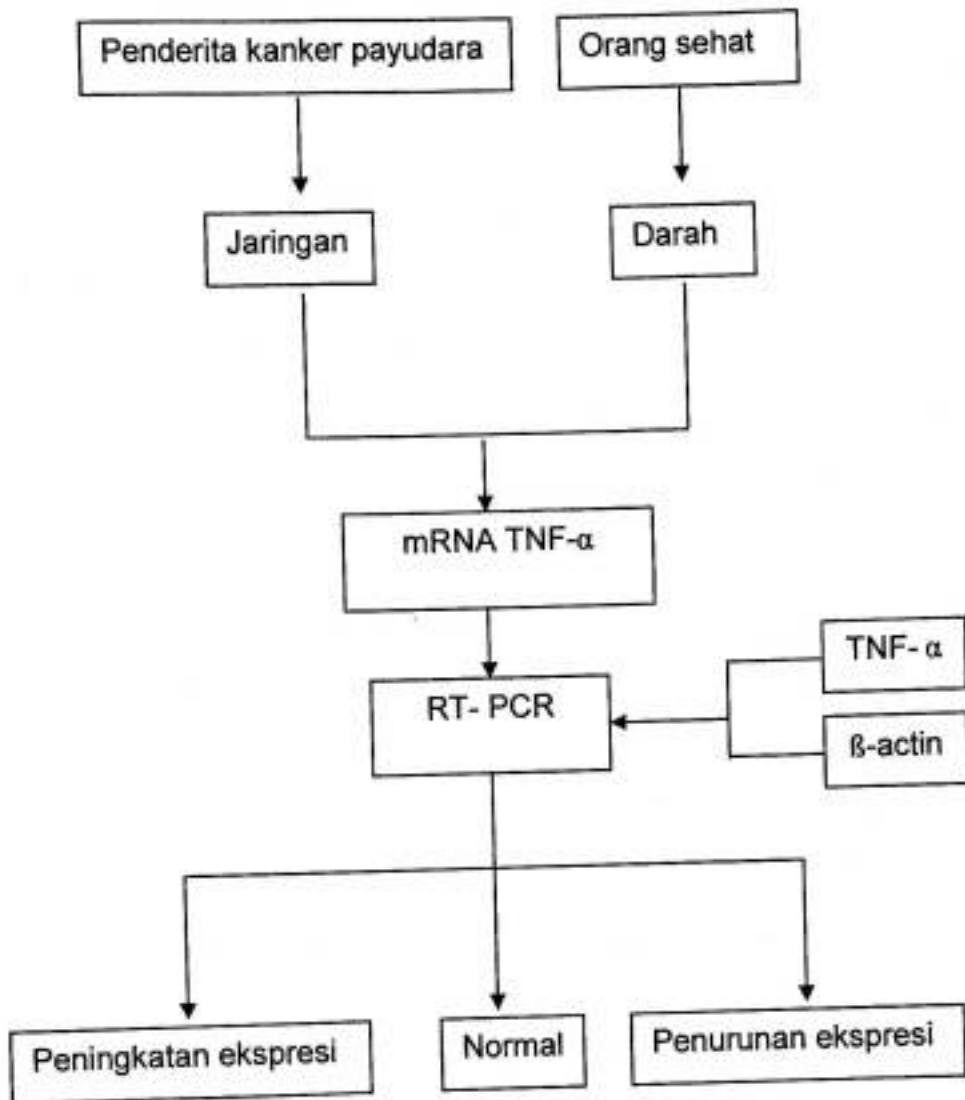
1. Sukardja IDG. *Onkologi Klinik*. Ed. 2. Airlangga University Press. Surabaya. 2000. hal. 47-48
2. Chyntia E. *Kanker Payudara*. Maximus. Yogyakarta. 2009. hal. 63, 84-85
3. Haryana SM, Soesatyo M. *Aspek Genetika dan Immunologik Kanker Payudara*. Makalah disajikan dalam Seminar Ilmiah Populer Kanker Payudara. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta, 4 Agustus 2005.
4. Halim B, Sahil MF. *Imunologi Kanker*. CDK [serial on the internet]. 2001; [dikutip 14 September 2009];132:[5 screen]. Available from: <http://www.kalbe.co.id>
5. Baratawidjaja KG. *Imunologi Dasar*. Ed.7. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 2006. hal. 17-18, 35-36, 124
6. Boedina S. *Imunologi, Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Ed. 4. Balai Penerbit FKUI. Jakarta. 2001. hal. 63-63, 79, 208-210
7. Hatta M. *Advance Experimental in Medical Biology*. Plenum Publisher. New York. 2003. pp 269-278. Available as PDF file
8. Price SA, Wilson LM. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ed. 6. Terjemahan oleh Brahm U. pendit, Huriawati Hartono, Pita Wulansari, dan Dewi Asih Mahanani. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 2006. hal. 82,151
9. Haylock PJ, Curtiss CP. *How to Beat Cancer*. Ilmu Populer Kelompok Gramedia. Jakarta. 2006. hal. 5,17
10. McCartney RA, Turkington CA. *Breast Cancer*. Health and Wellness Resource Center. [serial on the internet]. 2005. [dikutip 25 Januari 2010] vol 2.[14 screen]. Available from: <http://www.unhas.ac.id>
11. Indrawati M. *Bahaya Kanker bagi Wanita dan Pria*. AV Publisher. Jakarta. 2009. hal. 2, 7, 206-207
12. Sartono ML. *Biologi Sel Molekuler, Variasi, dan Keturunan*. Universitas Trisakti. Jakarta. 2006. hal. 41-46, 93

13. Twyman R. *Gene Expression. The Human Genome*. 8 Januari 2003; [dikutip 7 Februari 2010]. Available at: <http://genome.wellcome.ac.uk>
14. Juwono, Juniarto AZ. *Biologi Sel*. Penerbit Buku Kedokteran. 2000. hal. 77-78
15. Stansfield W, Cano R. *Biologi Molekuler dan Sel*. Penerbit Erlangga. 2006. hal. 40,59
16. Roitt IM, Delves PJ. *Essential Immunology*. 10th ed. Blackwell Science. London. 2004. pp. 379-380. Available as PDF file
17. Virella B. *Medical Immunology*. 6th ed. Informa Health Care. New York. 2007. pp. 369-372. Available as PDF file
18. De Witte M, Shealy DJ, Nakada MT, Anderson GM. Tumor Necrosis Faktor and Cancer. In: Caliguri MA, Lotze MT, editors. *Cytokines in The Genesis and Treatment of Cancer*. Humana Press. Totowa. 2007. pp.71. Available as PDF file
19. Bendtzen K, Ross C, Meyer C, Hansen MB, Svenson M. *Natural and Induced Anticytokine Antibodies in Humans*. In: *Cytokine Inhibitors*. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001
20. Karsono B. Teknik-Teknik Biomolekuler dan Seluler pada Kanker. Di dalam Aru WS, Bambang Setiyadi, Idrus Alwi, dan setiati, editor. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Ed.2. Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran UI. Jakarta. 2006. hal. 816
21. Yuwono T. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Penerbit Andi. Yogyakarta. 2006. hal. 1, 5-6,11
22. Aust G. Competitive RT-PCR to Quantify Small Amounts of mRNA. In: De Ley M, editor. *Cytokine Protocols*. Humana Press. Totowa. 2007. pp 31-40. Available as PDF file
23. Buckingham L, Flaws ML. *Molecular Diagnostics*. Davis Company. New York. 2007. pp. 72-77,81
24. Vernal R, Velasquez E, Gamonal J, Jose A. *Expression of Proinflammatory Cytokines in Osteoarthritis of Temporomandibular Joint*. Intl. Elsevierhealth [serial on the internet]. 17 April 2008; [dikutip 7 Oktober 2009]; 53:[6 screen]. Available from: <http://www.sciencedirect.com>

25. Guiletty A, Overbergh L. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Ideal*. [serial on the internet]. 2001[dikutip 23 Februari 2010]; Vol.25 [8 screen]. Available from: <http://www.idealibrary.com>
26. Yamamura M. *Defining Protective Responses to Pathogens: Cytokine Profiles in Leprosy Lesions*. *Science* [serial on the internet]. 4 Maret 2009; [dikutip 7 Oktober 2009]; 254:[3 screen]. Available from: <http://www.sciencemag.org>

LAMPIRAN I

Skema Alur Penelitian



LAMPIRAN II

DNA Manusia untuk TNF- α

>tnf-a mRNA-AK314960

1 agacgctccc tcagcaagga cagcagagga ccagctaaga gggagagaag caactacaga
61 cccccctga aaacaacct cagacgccac atcccctgac aagctgccag gcaggttctc
121 ttctctcac atactgacct acggctccac cctctctccc ctggaaagga caccatgagc
181 actgaaagca tgatccggga cgtggagctg gccgaggagg cgctcccaa gaagacaggg
241 gggcccagg gtccaggcg gtgctgttc ctcagcctct tctcttct gatcgtggca
301 ggcgccacca cgctctctg cctgctgcac ttggagtga tcggcccca gagggaagag
361 ttcccaggg acctctct aatcagccct ctggc ccagg cagtcagatc atctctcga
421 acccgagtg acaagcctgt agccatggt gtagcaaacc ctcaagctga ggggcagctc
481 cagtggctga accgccggc caatgccctc ctggccaatg gcgtggagct gagagataac
541 cagctggtg tgccatcaga gggcctgtac ctatctact cccaggtcct ctcaagggc
601 caaggctgcc cctccacca tlgctctc acccacacca tcagccgat cgccgtctc
661 taccagacca aggtcaacct cctctctgcc atcaagagcc cctgccagag ggagaccca
721 gagggggctg aggccaagcc ctggtatgag cccatctatc tgggaggggt ctccagctg
781 gagaagggg accgactcag cgctgagatc aatcggccg actatctcga cttgccgag
841 tctgggcagg tctactttg gatcattgcc ctgtga

Forward : cagcctctctctctctgat

Reverse : gccagagggctgattagaga

TCTCTAATCAGCCCTCTGGC (Complementary Reverse)

//

> best β -actine X00351

1 ttgccgatcc gccgcccgtc cacaccgcc gccagctcac catggatgat gafatcgccg
61 cgctcgtcgt cgacaacggc tccggcatgt gcaaggccgg ctcgcgggc gacgatgccc
121 cccgggcccgt ctccccctcc atcgtggggc gccccaggca ccagggcgtg atgggggca
181 tgggtcagaa ggattcctat gtgggcgacg aggccagag caagagaggc atcctcacc
241 tgaagtacc catcgagcac ggcatcgtca ccaactggga cgacatggag aaaatctggc
301 accacacctt ctacaatgag ctgctgtgg ctcccgagga gcaccccgtg ctgctgaccg
361 agggccccct gaacccaag gccaaccgag agaagatgac ccagatcatg ttgagacct
421 tcaacacccc agccatgtac gttgctatcc aggctgtgct atccctgtac gcctctggc
481 gtaccactgg catcgtgatg gactccggtg acggggtcac ccacactgtg cccatctacg
541 aggggtatgc cctccccat gccatctgc gctggacct ggctggccgg gacctgactg
601 actacctcat gaagatctc accgagcgcg gctacagctt caccaccacg gccgagcggg
661 aaatcgtcgc tgacattaag gagaagctgt gctacgtcgc cctggacttc gagcaagaga
721 tggccacggc tgctccagc tctcccctgg agaagagcta cgagctgcct gacggccagg
781 tcatcaccat tggcaatgag cggctccgtc gccctgaggc actctccag cctcctcc
841 tgggcatgga gtcctgtggc atccacgaaa ctacctcaa ctccatcatg aagtgtgacg
901 tggacatccg caaagacctg tacgccaaca cagtgtgtc tggcggcacc accatgtacc
961 ctggcattgc cgacaggatg cagaaggaga tctctgccct ggcacccagc acaatgaaga
1021 tcaagatcat tgctcctcct gagcgaagt actccgtgtg gatcggcggc tccatcctgg
1081 cctcgtgtc cacctccag cagatgtgga tcagcaagca ggagatgac gactccggcc
1141 cctccatcgt ccaccgaaa tgctctagg cggactatga cttagttgcg ttacaccctt
1201 tctgacaaa acctaactg cgagaaaac aagatgagat tggcatggct tttttgtt
1261 ttttgttt gtttggtt tttttttt ttggctga ctcaggatt aaaaactgga
1321 acggtgaagg tgacagcagt cggttggagc gagcatcccc caaagttcac aatgtggccg
1381 aggacttga ttgcacattg ttgttttt aatagtcatt ccaaatatga gatgcattg
1441 tacaggaagt ccctgccat cctaaaagcc accccacttc tcttaagga gaatggcca



1501 gtcctctccc aagtcacac aggggaggig atagcattgc ttctgttaa attatgtaat
1561 gcaaaaatttt ttaactctc gccttaatac tttttattt tgtttattt tgaatgatga
1621 gccttcgtgc cccccctcc cccttttgt cccccaactt gagatgatg aaggctttg
1681 gtctccctgg gagtgggtgg aggcagccag ggcttacctg tacactgact tgagaccagt
1741 tgaataaaag tgcacacctt a

Forward : gtggggcgccccaggcacca

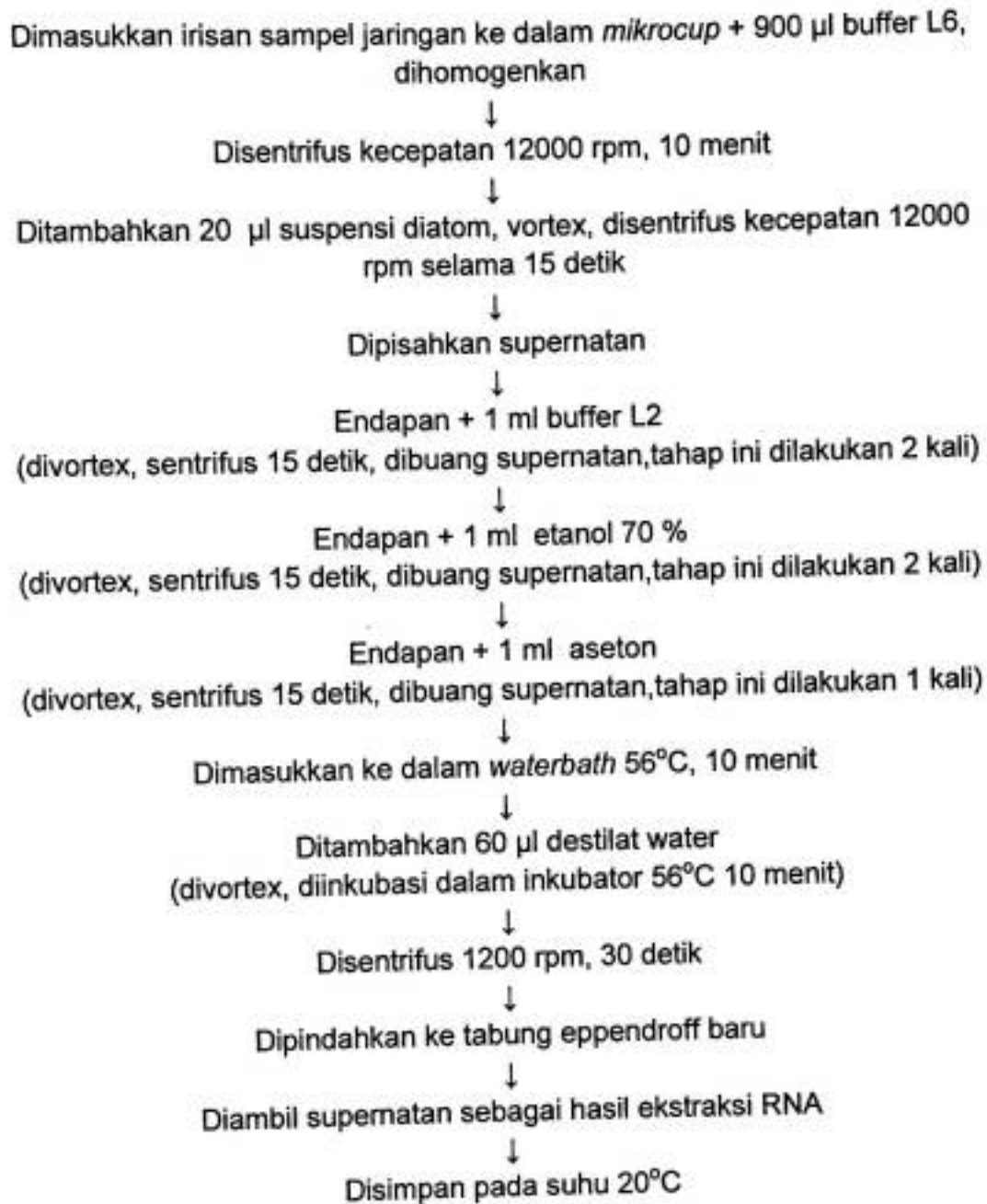
Reverse : ctcttaatgtcacgcacgattc

GAAATCGTGCGTGACATTAAGGAG (Complementary Reverse)

//

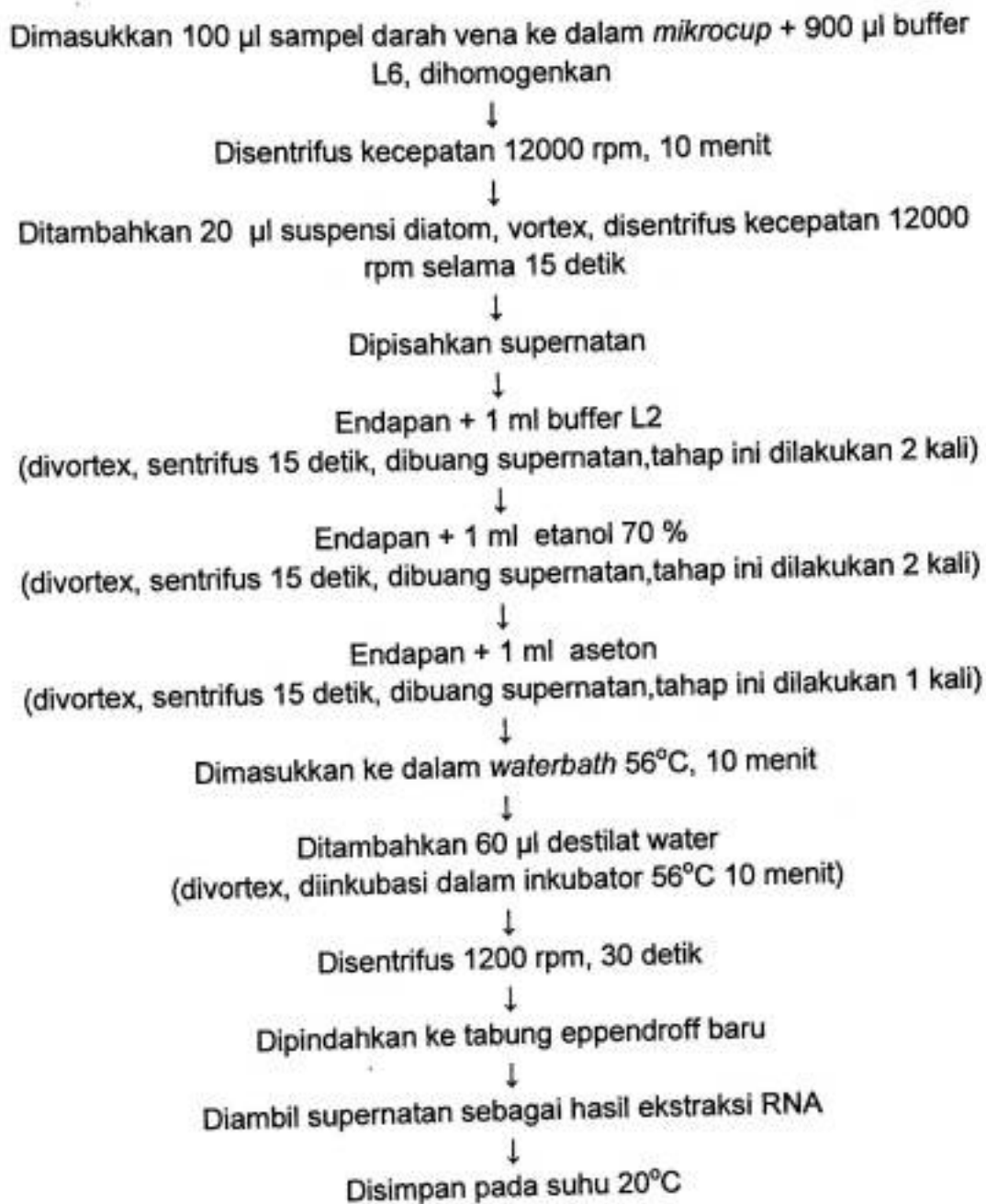
LAMPIRAN III

Ekstraksi RNA TNF- α dari jaringan kanker payudara dengan metode Boom



LAMPIRAN IV

Ekstraksi RNA dari darah vena orang sehat dengan metode Boom



LAMPIRAN V

Amplifikasi RNA TNF- α dengan Teknik RT-PCR

2,5 μ l hasil ekstraksi RNA + 22,5 μ l PCR mix



Dimasukkan ke dalam tabung 250 μ l



Dimasukkan ke mesin PCR



Denaturasi, suhu 95°C, 30 detik



Anneling, suhu 56°C, 30 detik



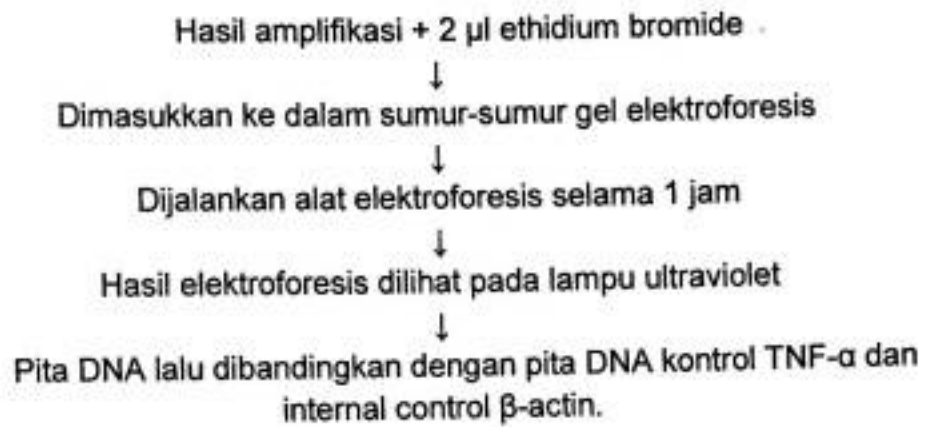
Elongating, suhu 72°C, 30 detik



Hasil PCR dianalisa dengan elektroforesis

LAMPIRAN VI

Analisa Hasil PCR dengan Metode Elektroforesis



LAMPIRAN VII

Perhitungan Mean Ekspresi Gen TNF- α

1. Mean dari Sampel Jaringan Kanker Payudara

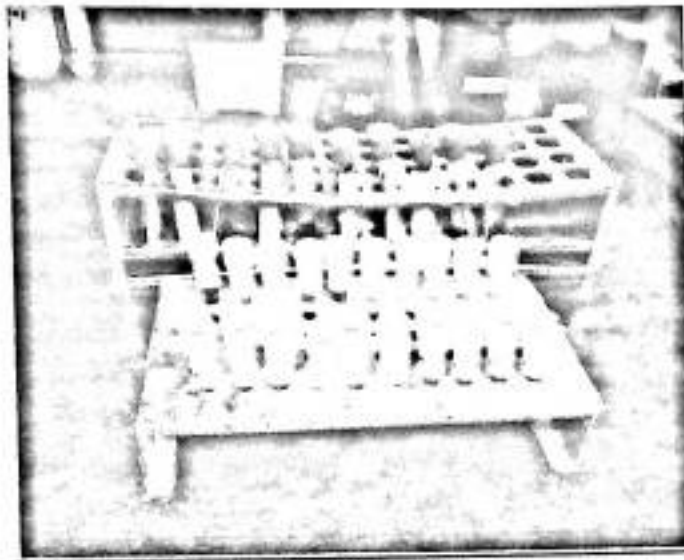
$$\begin{aligned}\text{Mean : } \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^n f_i \cdot x_i}{\sum f_i} \\ &= \frac{(1.0)+(2.0)+(3.4)+(4.4)+(5.2)}{10} \\ &= 3,8\end{aligned}$$

2. Mean dari Sampel Darah Vena Orang Sehat

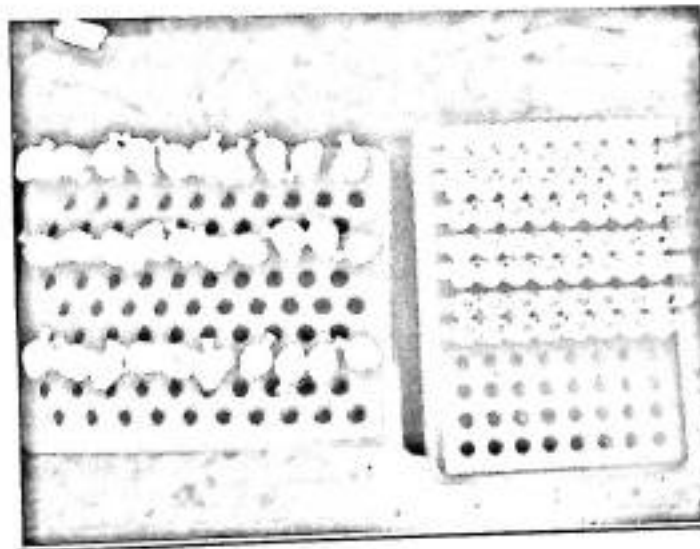
$$\begin{aligned}\text{Mean : } \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^n f_i \cdot x_i}{\sum f_i} \\ &= \frac{(1.3)+(2.5)+(3.0)+(4.0)+(5.2)}{10} \\ &= 2,3\end{aligned}$$

LAMPIRAN VII

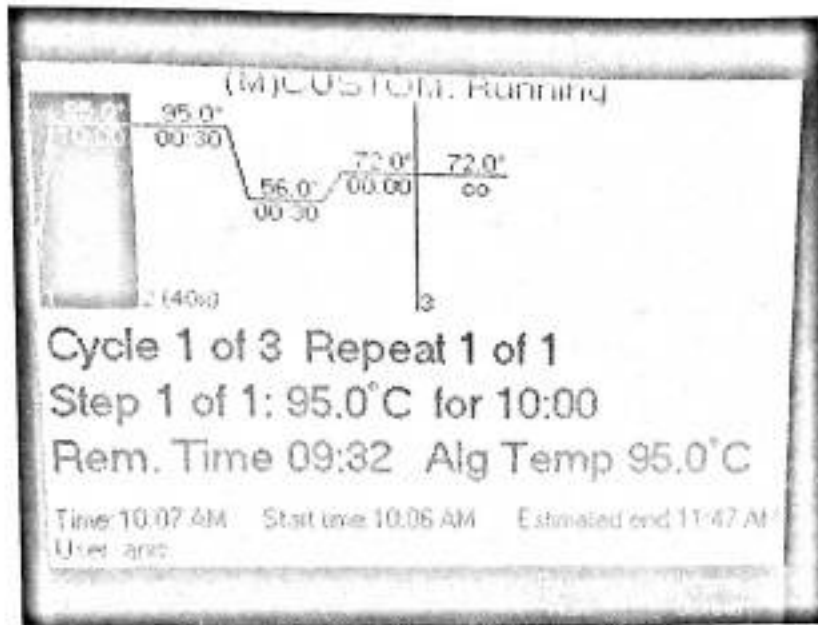
Foto Hasil Penelitian



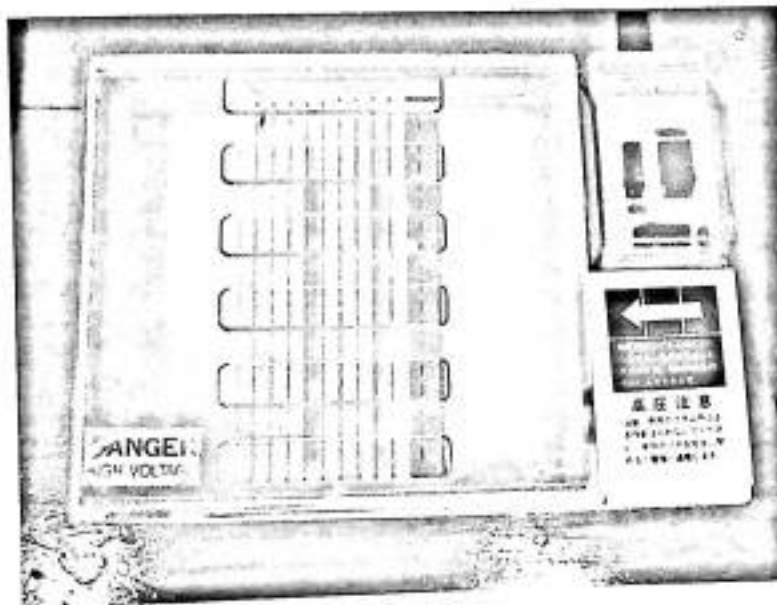
Gambar 4. Sampel jaringan kanker payudara dan darah vena orang sehat



Gambar 5. Hasil ekstraksi jaringan kanker payudara dan darah vena orang sehat



Gambar 6. Proses amplifikasi pada PCR



Gambar 7. Proses elektroforesis