

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kitosan

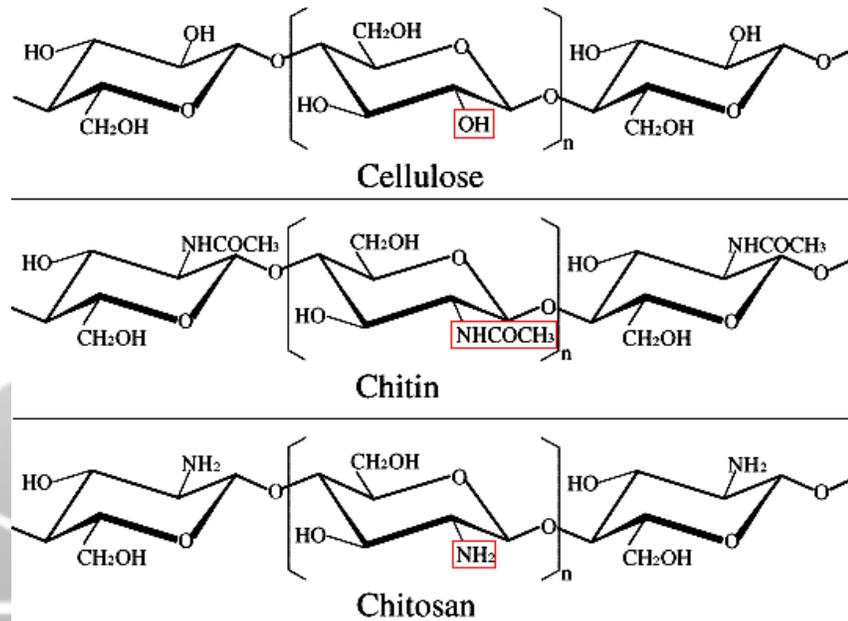
Kitosan adalah turunan dari kitin, merupakan penyusun kulit hewan-hewan krustasea, seperti udang, kerang, dan juga beberapa eksoskeleton dari serangga serta dinding sel dari beberapa jenis fungi.^{(7),(8)} Kitosan sangat mudah didapat dari kepiting, khususnya *Dungeness crab (Cancer magister)*; udang, khususnya udang *Pacifik (Pandalus borealis)*; lobster; dan kulit udang karang. Menurut Knorr, cangkang atau kulit hewan krustasea mengandung 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat dan kalsium fosfat, dan 20-30% kitin⁽²³⁾. Sedangkan kulit kepiting mengandung 15,6%-23,9% protein, 53,7%-78,4% kalsium karbonat, dan 18,7%-32,2% kitin, hal ini juga tergantung pada jenis kepiting dan tempat hidupnya.⁽²⁴⁾ Sumber kitin dan kitosan akan mempengaruhi berat molekul, kemurnian dan morfologi kristal kitin dan kitosan tersebut.⁽¹⁸⁾

2.1.1 Struktur kimia kitosan

Secara kimiawi, kitosan merupakan polisakarida *linear* yang berupa β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose⁽²⁵⁾ dimana strukturnya mirip dengan glikosaminoglikan.⁽²⁶⁾ Secara rinci, kitosan adalah hetero-polimer⁽²⁵⁾ antara glukosamina (2-amino-2-deoksi- β -D-glukosa) yang berikatan dengan polimer β -1,4 dan mengandung N-asetil-glukosamina yang lebih sedikit. Sedangkan kitin, terdiri atas rantai linear gugus asetil-glukosamina.

Pada gambar 2.1 dapat dilihat bahwa selulosa adalah homo-polimer, sedangkan kitin dan kitosan adalah hetero-polimer. Perbedaan ini dapat dilihat pada posisi C-2, dimana kitosan yang

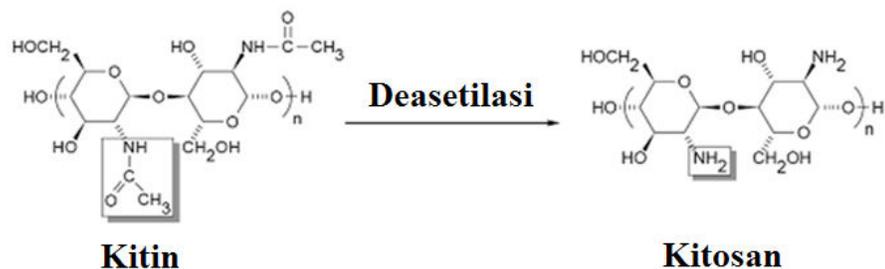
memiliki gugus amin ($-\text{NH}_2$), kitin yang memiliki gugus $-\text{NHC}\text{OCH}_3$ dan selulosa yang memiliki gugus hidroksil ($-\text{OH}$).⁽²³⁾



Gambar 2.1. Struktur kimia dari (a) selulosa dan (b) kitin dan kitosan (kitin ditemukan dalam bentuk N-asetil dan kitosan ditemukan dalam bentuk amino)⁽²³⁾

Sumber: Fouda MMG. Use of Natural Polusaccharides in Medical Textile Application. Krefeld: University of Duisburg-Essen; 2005.

Pada gambar 2.2, terlihat lebih jelas perbedaan kitin dan kitosan, pada $-\text{NH}-\text{CH}_3-\text{CO}$ yang dimiliki kitin, dan gugus $-\text{NH}-\text{H}$ pada kitosan. Proses penyingkiran gugus asetil yang merupakan proses deasetilasi, bertujuan untuk membuat kitin menjadi kitosan.⁽²⁵⁾



Gambar 2.2. Perbedaan antara kitosan dan kitin.

Sumber: Fernandez-Kim S-O. Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols. Louisiana: Louisiana State University; 2004.

2.1.2 Derajat Deasetilasi (DD)

Derajat Deasetilasi (DD) menunjukkan banyaknya gugus amino bebas dalam polisakarida kitosan. Secara langsung, DD akan mempengaruhi sifat fisik-kimia dari produk kitosan⁽²⁷⁾ dan juga mempengaruhi biodegradabilitas serta aktifitas imunologinya.⁽²⁸⁾ DD kitosan berkisar antara 56% hingga 99%^(23, 25) dengan rata-ratanya sekitar 80%, tergantung dari jenis krustasea dan metoda pembuatannya.⁽²³⁾ Biasanya, kitin dengan DD 75% atau lebih biasanya juga dianggap sebagai kitosan.^(23, 29)

2.1.3 Karakteristik kitosan

Secara biologis, kitosan memiliki biokompabilitas yang tinggi, biodegradabilitas yang baik, kemampuan untuk membentuk lapisan film (lapisan pelindung) dan dapat diadsorpsi dengan baik oleh tubuh. Efek biokompatibilitas yang dimiliki kitosan disebabkan karena strukturnya yang mirip dengan glukosamina pada matriks ekstra selular.⁽³⁰⁾ Kitosan juga stabil secara fisiologis tetapi tetap dapat dimodifikasi dengan mudah secara kimiawi.⁽¹¹⁾

Ciri khusus lain adalah memiliki muatan ion positif^(23, 27), dimana kemampuan ini membuat kitosan dapat berlekatan dengan muatan negatif dari lemak, lipid, kolesterol, ion logam, proterin,

dan molekul makro.⁽⁴⁶⁾ Karena berupa serat seperti selulosa, kitosan memiliki karakteristik struktur optikal.⁽³¹⁾

2.1.4 Kelarutan kitosan

Kitosan dapat larut dalam mineral yang diencerkan dalam air (*dilute mineral*) atau asam organik yang mengandung grup amino bebas dengan pH di bawah 6.0. Asam organik ini dapat berupa asam asetat atau asam format yang telah banyak digunakan secara luas untuk penelitian dan aplikasi kitosan. Beberapa jenis asam organik yang dapat melarutkan kitosan dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Beberapa jenis asam lemah dan konsentrasinya yang dapat melarutkan kitosan.

Sumber: Fouda MMG. Use of Natural Polusaccharides in Medical Textile Application. Krefeld: University of Duisburg-Essen; 2005.

Asam	Konsentrasi kitosan yang dilarutkan				
	1%	5%	10%	50%	>50%
<i>Acetic</i>	+	+	+		
<i>Adipic</i>	+				
<i>Citric</i>	-	+	+		
<i>Formic</i>	+	+	+	+	+
<i>Lactic</i>	+	+	+		
<i>Malic</i>	+	+	+		
<i>Malonic</i>	+	+	+		
<i>Oxallic</i>	+		+		
<i>Propionic</i>	+	+	+	+	
<i>Succinic</i>	+	+	+		
<i>Tartaric</i>	-		+		

Simbol (+) menginformasikan bahwa kitosan dengan konsentrasi tersebut dapat larut dalam jenis asam, sedangkan

simbol (-) menandakan sebaliknya. Tampak bahwa, asam asetat dapat melarutkan kitosan hingga pada konsentrasi 10%. Beberapa penelitian menunjukkan bila pH diatas 7.0, kitosan tidak mempunyai kelarutan yang baik.⁽²³⁾

Bila dibandingkan dengan berat molekul, kelarutan kitosan menurun seiring dengan peningkatan berat molekul.⁽²³⁾ Temperatur juga mempengaruhi kelarutan kitosan, konsentrasi asam asetat pada temperatur tinggi dapat menyebabkan depolimerisasi dari kitosan.⁽²³⁾

Hasil hidrolisis kitosan yang berupa oligomer, dengan polimerisasi 8 atau kurang dari 8, dapat larut dalam air tanpa dipengaruhi oleh faktor pH.⁽³²⁾

2.1.5 Berat Molekul

Kitosan adalah biopolimer dengan berat molekul tinggi. Berat molekul kitosan komersial biasanya, bergantung dari proses dan kualitas produksi.⁽¹¹⁾

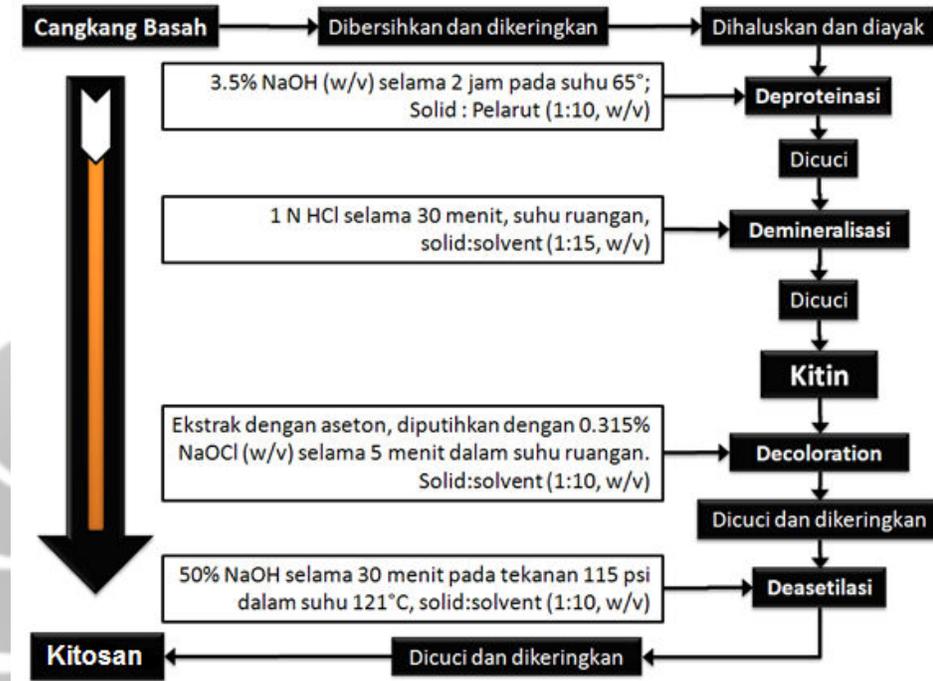
Secara umum, temperatur tinggi, kelarutan oksigen dan *shear stress* dapat menyebabkan degradasi kitosan. Sebagai contoh, pada temperatur lebih dari 280°C, kitosan akan terdegradasi karena suhu dan rantai polimer perlahan akan terputus, menjadi kitosan dengan berat molekul yang lebih rendah.⁽²⁷⁾

2.1.6 Warna

Pigmen dari cangkang krustasea membentuk kompleks dengan kitin (4-keto dan tiga derivat 4, 4'-diketo- β -carotene).⁽²⁷⁾ Di alam, bubuk kitosan sedikit lunak dan warnanya beraneka ragam dari kuning pucat hingga putih, sedangkan tepung dan selulosa memiliki tekstur yang halus dan bewarna putih.

2.1.7 Pembuatan kitin dan kitosan

Kitosan diekstrak dari limbah kulit krustasea misalnya kepiting, udang, lobster, dan udang karang. Kulit ini terdiri dari 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat, dan 20-30% kitin pada basis kering.⁽³³⁾



Gambar 2.3. Pembuatan kitosan dari cangkang mentah

Sumber: Fernandez-Kim S-O. Physicochemical and Functional Properties of Crawfish Chitosan as Affected by Different Processing Protocols. Louisiana: Louisiana State University; 2004.

Banyak cara untuk mengekstrak kitosan dari cangkang krustasea. Salah satunya seperti gambar 2.3. Isolasi kitosan dari kepiting meliputi beberapa tahap: Demineralisasi (DM), Deproteinasi (DP), Dekolorasi (DC), serta Deasetilasi (DA). Tahap pemisahan Kitin hanya memerlukan 2 tahapan: Demineralisasi (DM) dan Deproteinasi (DP), yang melibatkan pemisahan kalsium karbonat. Kedua tahap demineralisasi dan deproteinisasi ini dapat dibalik urutannya.⁽³⁴⁾

Kitin yang telah melewati tahap deproteinasi dan deproteinasi berwarna merah muda karena adanya pigmen *astaxanthin*. Pigmen ini dieliminasi pada tahap dekolorasi (DC) menggunakan produk pemutih. Hasilnya adalah kitin yang tidak larut dalam pelarut organik. Sedangkan, kitosan, deasetilasi dari derivat kitin ini larut dalam asam lemah.

Perubahan kitin menjadi kitosan merupakan tahap Deasetilasi (DA). Proses deasetilasi melibatkan pembuangan gugus asetil dengan reaksi kimia dari rantai molekul, meninggalkan gugus kitosan dalam berbagai tingkatan gugus amino (-NH₂). Dalam tahap ini kitosan didapat dengan menggunakan larutan natrium hidroksida (40-50%) pada suhu 100°C atau lebih dalam waktu 30 menit hingga gugus asetil hilang sebagian atau seluruhnya dari polimer.⁽³⁵⁾

Beberapa instansi di Indonesia seperti Badan Tenaga Atom Nasional, Departemen Kelautan dan Perikanan, dan Institut Pertanian Bogor (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan) telah memproduksi Kitosan.⁽³⁰⁾

2.1.8. Efek kitosan terhadap sel.

Kitosan yang berasal dari dinding sel jamur maupun dari krustasea memiliki efek toksis untuk sel⁽³⁶⁾. Beberapa penelitian mengatakan bahwa kitosan memiliki efek terhadap sel limfosit. Kitosan memiliki konsentrasi tertentu agar dapat bersifat toksik terhadap sel limfosit. Kitosan yang berasal dari krustasea ini akan menekan proliferasi limfosit pada konsentrasi 50 µg/ml and 100 µg/ml.⁽³⁶⁾ Pada konsentrasi yang lebih tinggi kitosan akan menempel pada permukaan membran sel dan dapat merusak fungsi membran sel tersebut (Su et al., 1999).

Pemberian kitosan secara *in vivo* kedalam sel akan menyebabkan kitosan didegradasi oleh lisozim dan

glukosaminidases yang ada pada sel hewan, menjadi bentuk yang lebih sederhana untuk dapat dicerna (Shibata et al., 1997).

Terhadap sel fibroblast, kitosan akan merangsang fibroblas untuk melepas interleukin yang akan menyebabkan fibroblast bermigrasi dan berproliferasi.⁽³⁷⁾ Menurut beberapa artikel dan penelitian, percepatan proliferasi sel ini dikarenakan gugus amino dan hidroksil reaktif yang dimiliki oleh kitosan.⁽³⁷⁾ Gugus amino yang dimiliki oleh kitosan ini memiliki kesamaan secara struktur dengan gugus amino pada glukosamin terasetilasi.⁽³⁸⁾

Kitosan juga banyak digunakan sebagai pengantar obat kedalam sel. Hal ini ditunjang dengan kemampuan kitosan yang mudah untuk menembus membran sel. Menurut beberapa penelitian, kitosan dapat meningkatkan masukan heparin kedalam dinding sel kanker melanoma pada tikus.⁽³⁹⁾

Efek kitosan yang menekan proliferasi sel juga terlihat pada mekanisme apoptosis pada sel makrofag. Pada sel makrofag, kitosan akan masuk ke dalam sel melalui reseptor mannose. Setelah masuk ke dalam makrofag, kitosan akan di degradasi oleh lisozim menjadi *N-acetyl-D-glucosamine* lalu kitosan akan merangsang reseptor protein yang memediasi terjadinya fas apoptosis.⁽⁴⁰⁾ Kitosan terbukti dapat berlekatan dengan reseptor mannoses ini. Lalu mempercepat signal fas sehingga apoptosis terjadi.⁽⁴⁰⁾ Ini dibuktikan dengan menambahkan mannan (bahan aktif untuk menghambat interaksi antara reseptor protein dengan kitosan) akan mengurangi jumlah sel yang mati karena apoptosis.

2.2 Kultur Sel

Sel adalah struktur dasar dan unit fungsional terkecil yang menyusun organisme. Sulit untuk melihat struktur dan komposisi molekul, serta fungsi berbagai komponen sel.⁽⁴¹⁾ Kultur sel adalah proses mengembangbiakkan sel dibawah kondisi terkontrol pada lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya.⁽⁴²⁾ Sel

yang ditumbuhkan berasal dari eukariotik multiselular, khususnya sel manusia dan hewan.⁽⁴³⁾ Saat ini kultur sel telah menjadi salah satu objek utama dalam berbagai penelitian tentang kehidupan.⁽⁶³⁾

Kultur sel terbagi menjadi kultur sel primer dan kultur sel sekunder (*cell line*).⁽⁴⁴⁾ Kultur sel primer adalah kultur sel yang diperoleh secara langsung dari pemisahan jaringan suatu organisme⁽⁴⁴⁾ melalui pemotongan jaringan normal dan dikultur sebagai sebuah sel dengan bantuan enzim.⁽⁴⁵⁾ Sel primer ini hanya dapat dipertahankan dalam periode waktu tertentu.⁽⁴⁵⁾ Sedangkan kultur *cell line* adalah keturunan sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatik ataupun secara mekanis.⁽⁴⁴⁾

Kultur sel dapat dilakukan dalam dua bentuk, menumbuhkan sel dalam suspensi yang berupa kumpulan sel yang mengambang bebas dalam medium, atau berupa monolayer yang berlekatan dengan dasar wadah kultur. Bentuk kultur ini bergantung dari bentuk jaringan asal; misalnya *cell line* turunan dari darah (leukaemia dan lymphoma) akan tumbuh dalam media suspensi, sedangkan *cell line* turunan dari jaringan padat (paru-paru dan epitel) cenderung untuk tumbuh sebagai *monolayers*.⁽⁴⁵⁾

Keunggulan kultur sel adalah lingkungan hidup sel dapat diatur, karakteristik sel dapat digambarkan dengan jelas, dan mudah diukur. Keterbatasan kultur sel adalah mudah terkontaminasi, genetik dan fenotip yang tidak stabil, dan relatif mahal.^(44, 45)

Dalam mengatur lingkungan hidup sel, perlu diperhatikan hal-hal yang berhubungan untuk pertumbuhannya, seperti lingkungan yang steril, suplai nutrisi untuk tumbuh, temperatur dan pH yang stabil.⁽⁴⁵⁾ Oleh karena itu, untuk mengkultur sel digunakan wadah plastik atau kaca yang sesuai, serta medium yang mengandung faktor pertumbuhan tertentu.^(41, 42) Unsur dasar dari media antara lain: garam anorganik, karbohidrat, asam amino, vitamin, asam lemak dan lipid, protein dan peptida serta serum.⁽⁴⁵⁾

2.2.1 Komposisi Media Kultur Sel

2.2.1.1 D-MEM

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) adalah modifikasi dari Basal Medium Eagle (BME) yang berisi asam amino dan vitamin. Formula awalnya berisi glukosa 1000 mg/L dan digunakan untuk mengembangbiakan sel embrio tikus. Lalu dikembangkan lagi media tersebut dengan kombinasi glukosa, L-*glutamine* dan sodium *pyruvate*. D-MEM *high glucose* adalah D-MEM dengan tingkat konsentrasi glukosa 4500 mg/L serta mengandung L-*glutamine*, sodium *pyruvate*, dan sodium bikarbonat.⁽⁴⁶⁾

2.2.1.2 Karbohidrat

Karbohidrat merupakan sumber energi utama yang merupakan turunan dari gula. Sumber gula utama adalah glukosa dan galaktosa, walaupun beberapa media juga berisi maltose dan fruktosa.⁽⁴⁵⁾ Glukosa ini akan dimetabolisme dalam proses glikolisis membentuk piruvat dan dapat diubah menjadi laktat atau menjadi asetoasetat dan memasuki siklus asam sitrat untuk membentuk CO₂.⁽⁴⁴⁾ Konsentrasi karbohidrat beragam dari 1g/L hingga 4.5g/L.⁽⁴⁵⁾

2.2.1.3 Serum

Serum, campuran kompleks dari albumin, faktor pertumbuhan dan penghambat pertumbuhan, merupakan salah satu konstitusi yang penting dalam media. Menurut banyaknya penggunaan jenis serum, serum yang paling banyak digunakan berturut-turut adalah *Calf Serum*, *Fetal Bovine Serum*, *Horse Serum* dan *Human Serum*. Dalam penelitian ini, digunakan *Fetal Bovine Serum* (FBS). Kualitas, tipe dan konsentrasi serum mempengaruhi pertumbuhan sel. Sebelum digunakan, sebaiknya

serum dites dalam menghasilkan *cloning efficiency*, *plating efficiency* dan kemampuan menjaga karakter sel.

Serum juga membantu melindungi sel terhadap bahaya mekanis saat pencampuran sel atau saat dipanen dengan *cell scraper*. Serum juga mampu berlekatan dan menetralkan racun. Dalam penggunaannya, serum harus diinkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit untuk menghilangkan kontaminasi beberapa jenis virus, khususnya bovine viral diarrhoea virus (BVDV) dan mycoplasma.⁽⁴⁵⁾ Salah satu contoh serum yang sering digunakan dalam kultur sel adalah *Fetal Bovine Serum* (FBS). FBS diambil dari serum fetus hewan dan tidak ada tambahan campuran kimia lainnya.⁽⁴⁷⁾ Tambahan 10% FBS menghasilkan tambahan 4.8 mg protein/mL pada cairan kultur.⁽⁴⁵⁾

2.2.1.4 Antibiotik dan antifungal

Tujuan ditambahkan antibiotik dan antifungi kedalam medium kultur adalah untuk menjaga media kultur sel bebas dari bakteri dan jamur, tanpa membunuh sel kultur tersebut. Antibiotik yang biasanya digunakan adalah antibiotik penicilline dan streptomycine dengan komposisi Sodium *Chloride*, Penicillin G sodium, dan *Streptomycin Sulfate*.⁽⁴⁸⁾ Jenis ini dapat membunuh bakteri aerob-anaerob, bakteri anaerob dan jamur. Penicillin G akan mengganggu tahap akhir dari sintesis dinding sel dan Streptomycin Sulfate akan berlekatan dengan subunit 30S menyebabkan salah pembacaan transkrip genetik. Keduanya merupakan antibiotik spectrum luas (dapat membunuh bakteri gram positif dan negatif).⁽⁴⁸⁾

Selain itu, biasanya ditambahkan pula bahan antifungal; antara lain amphotericin B. Komposisi dari bahan ini adalah 250 mg/L amphotericin B dan 205 mg/L sodium *deoxycholate* dalam air.⁽⁴⁹⁾ Amphotericin B akan mengubah fungsi dan integritas dari membran sel eukariotik dengan membentuk kompleks kolesterol

dan menyebabkan kebocoran glukosa. Amphotericin B terlihat toksik pada sel mamalia pada konsentrasi 30 µg/mL.

2.2.2 Fungsi kultur sel

Berbagai perilaku, karakteristik, dan bentuk sel dapat diamati pada kultur sel. Empat karakteristik sel yang dapat digunakan untuk mengevaluasi kultur sel adalah morfologi sel, kecepatan pertumbuhan, efisiensi pertumbuhan, viabilitas sel dan fungsi khusus lain yang dilakukan sel.⁽⁴²⁾ Oleh karena itu, kultur sel memiliki kegunaan yang bervariasi, antara lain untuk pengamatan biokimia sel, uji toksik suatu bahan, penelitian kanker, deteksi dan isolasi suatu virus, serta terapi gen.^(44, 50)

2.3 Kanker

Kanker, yang disebut juga tumor ganas, berasal dari proliferasi abnormal berbagai macam sel dalam tubuh.⁽⁵¹⁾

2.3.1 Penyebab terjadinya kanker

Secara umum, kanker dapat disebabkan oleh perubahan genetik spontan, paparan terhadap mutagen atau radiasi, atau gen virus yang diinduksi. Ketiganya ini dapat menyebabkan gen normal menjadi bermutasi.

Perubahan menjadi keganasan ini disebabkan oleh perubahan proto-onkogen menjadi onkogen disertai dengan mutasi *Tumor Suppressor Gene* (TSG). Mutasi TSG berhubungan dengan mutasi gen dominan untuk dapat menunjukkan kelainannya. Mutasi proto-onkogen menjadi onkogen hanya memerlukan keadaan resesif. Dimana salah satu kromosom saja mengalami mutasi, maka sifat tersebut akan tercermin pada selnya.⁽⁵²⁾

2.3.1.1 Proto-onkogen dan onkogen

Proto-onkogen adalah gen normal yang terlibat dalam regulasi proliferasi sel ini. Melalui mutasi, proto-onkogen dapat berubah menjadi onkogen. Onkogen akan menghasilkan produk protein (onko protein) yang akan merubah sifat sel normal menjadi sel kanker.⁽⁵²⁾

Onkogen akan mengkode protein untuk membentuk onko protein. Onko protein ini sebenarnya adalah produk normal dari proto-onkogen. Hanya saja onko protein kehilangan elemen regulator yang penting dalam proliferasi sel, serta pembentukan onko protein nya oleh sel yang mengalami transformasi tidak tergantung pada faktor pertumbuhan atau sinyal-sinyal eksternal yang lain kedalam sel tersebut.⁽⁵²⁾

Perubahan proto-onkogen menjadi onkogen disebabkan oleh mutasi. Mutasi pada proto-onkogen menjadi onkogen terjadi dalam 3 cara; yaitu: *point mutation*, *gene amplification*, atau *chromosome rearrangement*. *Point Mutation* adalah perubahan pada salah satu basa DNA pada protoonkogen sehingga DNA tersebut akan menghasilkan protein yang aktif dalam jumlah yang normal. *Gene Amplification* adalah protoonkogen yang mengalami over ekspresi sehingga menghasilkan protein normal dalam jumlah yang berlebihan. *Chromosome rearrangement* adalah kromosom yang mengalami *translokasi*, dimana kromosom tersebut putus pada salah satu segmennya dan bergabung dengan segmen kromosom lain. Gen yang kromosomnya mengalami translokasi akan menghasilkan protein dalam jumlah yang berlebihan.⁽⁵²⁾

2.3.1.2 Tumor suppressor gene

TSG merupakan gen normal yang mengatur regulator dalam proliferasi sel normal dengan menghentikan terjadinya proliferasi sel.⁽⁵²⁾

Salah satu contoh TSG yang ada adalah gen p53. Hampir 50% tumor pada manusia mengandung gen p53 yang telah mengalami mutasi. Kehilangan gen p53 yang homozigot atau kedua alelnya hilang terjadi pada hampir semua kanker paru, kanker kolon dan payudara. Fungsi dari gen p53 ini adalah menghentikan siklus sel dan menstimulus terjadinya apoptosis pada sel tersebut bila terjadi *DNA damage*, sehingga integritas genom dapat terjaga. Bila terjadi DNA damage, p53 ini akan teraktifasi dan menempel pada DNA tersebut. Pada sel normal, *DNA damage* menyebabkan siklus sel berhenti pada fase G1. Selain itu, gen ini akan mengaktifkan *DNA repair* dan mengkode sel untuk membelah. Bila *DNA repair* gagal, maka sel tersebut akan mengalami apoptosis.⁽⁵³⁾

2.3.2 Klasifikasi kanker

WHO membagi tumor ganas menjadi tiga golongan berdasarkan kemampuan diferensiasinya.⁽⁵⁴⁾

- a. *Well differentiated*, sel masih berproliferasi membentuk lapisan *pearl keratin*.
- b. *Moderate differentiated*, sebagian sel masih berproliferasi membentuk lapisan *pearl keratin*, sedangkan sebagian merupakan sel basaloid.
- c. *Poor differentiated*, seluruhnya merupakan sel basaloid sehingga sulit dibedakan dengan sel normal sekitarnya.

Klasifikasi dan nomenklatur tumor berdasarkan Schneider AS, Szanto PA (2002):⁽⁵³⁾

A. Tumor ganas

1. Karsinoma

Karsinoma, merupakan sembilan puluh persen kanker pada manusia, dan sebagian besar berupa keganasan berasal dari sel epitel. Menurut Schneider et al. (2002), ada 3 jenis karsinoma; antara lain karsinoma sel skuamosa, karsinoma

sel transision, dan adenokarsinoma. Karsinoma sel skuamosa adalah tumor ganas yang berasal dari penebalan berlapis dari epitel skuamosa, misalnya pada kulit, mulut, kerongkongan dan vagina, dan tempat lainnya sejauh sel skuamosa mengalami metaplasia yang ditandai dengan produksi keratin. Karsinoma sel transision adalah tumor ganas yang berasal dari sel epitel transisional. Adenokarsinoma adalah tumor ganas yang berasal dari epitel glandular, termasuk tumor ganas dari mukosa gastrointestinal, endometrium, dan pankreas.

2. Sarkoma

Tumor ganas yang berasal dari lapisan mesenkim; misalnya dari tulang, disebut osteosarkoma; dari tulang dan otot, disebut rhabdomyosarcoma; dari otot halus, disebut leiomyosarcoma; serta dari lapisan lemak, disebut liposarcoma.

3. *Lymphoma*

Merupakan 7% dari keganasan pada manusia. Tumor ganas ini timbul pada sel pembentuk darah, dan sel pembentuk sistem imun^(53, 55)

4. *Eponymically*

Termasuk Burkitt lymphoma, Hodgkin disease, dan Wilms tumor.

5. Teratoma

Tumor ganas yang berasal dari derivat 3 lapisan sel kuman, yang dapat berisi struktur seperti kulit, tulang, kartilago, gigi, dan epitel intestinal.

B. Tumor jinak⁽⁵³⁾

1. Papiloma

Tumor jinak yang tumbuh dari permukaan epitel, misalnya epitel skuamosa dari kulit, laring, atau lidah. Ada dua jenis papiloma; antara lain *Papillary crystadenoma* dan

Fibroadenoma. *Papillary cystadenoma* adalah adanya tonjolan papila adenomatous yang masuk ke dalam ruang kista, misalnya cystadenoma pada ovarium. Fibroadenoma adalah proliferasi jaringan penghubung yang mengelilingi epitel glandular neoplastik. Misalnya fibroadenoma pada payudara.

2. Tumor jinak dari jaringan mesenkim

Misalnya leiomyoma, rhabdomyoma, lipoma, fibroma, dan chondroma.

3. Hamartoma

Pertumbuhan dari beberapa jenis sel yang tidak teratur dan ditemukan diantara organ. Misalnya hemangioma atau akumulasi pembuluh darah yang berlebihan.

2.3.3. Karakteristik sel kanker

Kanker dapat menginvasi organ sekitarnya dan bermetastasis ke organ yang lebih jauh melalui pembuluh darah, maupun limfa.^(53, 56) Organ yang menjadi tujuan sel ini biasanya hati, paru-paru, otak, kelenjar adrenal, nodus limfa, dan sum-sum tulang.⁽⁵³⁾

Sel tumor akan terus berproliferasi terus menerus tanpa terkontrol. Ini terjadi karena sel kanker memproduksi faktor pertumbuhan sendiri untuk menstimulasi proliferasinya. Produksi faktor pertumbuhan abnormal ini memicu pembelahan sel secara terus menerus. Sel tumor akan terus tumbuh dan bergerak hingga menyentuh sel tetangganya tanpa adanya *contact inhibition*, bermigrasi dalam keadaan yang tidak teratur, tumbuh dalam pola berlapis-lapis.⁽⁵⁵⁾

Faktor pertumbuhan yang dihasilkan sel kanker ini juga akan memicu formasi pembuluh darah baru (angiogenesis). Kapiler baru ini penting untuk mendukung nutrisi dan oksigen

baru bagi sel. Selain itu, pembuluh darah baru juga berperan dalam metastasis sel kanker.⁽⁵⁵⁾

Seluruh sel kanker kurang adesif daripada sel normal. Hal ini disebabkan karena berkurangnya sifat adesif dari molekul sel kanker. Sifat ini mendukung kemampuan sel kanker untuk bermetastasis ke organ lain, serta mempengaruhi morfologi dan sitoskeletal sel kanker. Banyak sel kanker lebih bulat daripada sel normal karena sel kanker kurang berlekatan kokoh dengan matriks ekstraselular maupun sel tetangganya.^(55, 57)

Sel kanker juga menghasilkan enzim protease, yang dilepas ke komponen maktrijs ekstraselular. Enzim ini akan menyerang jaringan normal di sekitarnya. Enzim lain yang disekresikan oleh sel ini adalah kolagenase, yang digunakan untuk mencerna dan berpenetrasi dalam basal lamina untuk menyerang lapisan yang lebih dalam.^(55, 58)

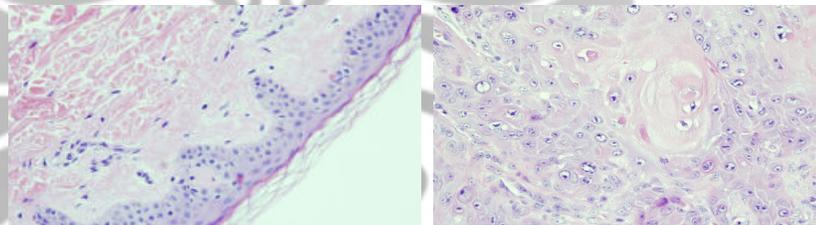
Salah satu keistimewaan sel kanker adalah sel ini tidak memiliki kemampuan untuk apoptosis. Apoptosis adalah kemampuan normal sel untuk mati karena adanya DNA *damage* maupun karena penyebab dari luar.

Penyebab terjadinya apoptosis dalam sel adalah *caspase*. *Caspase* ini disintesis dalam sel dalam bentuk *procaspase*. Dalam sel, *procaspase* akan diaktifkan pertama kali dan diperbanyak oleh adaptor protein. Apoptosis dapat terjadi dari penyebab ekstraselular maupun intraselular. Dari ekstraselular, sel limfosit akan menghasilkan fas ligan. Fas ligan ini akan berlekatan dengan reseptor fas protein pada membrane sel target. Reseptor ini kemudian akan berlekatan dengan adaptor protein. Adaptor protein akan menarik *procaspase* yang berada dalam sel target dan merubahnya menjadi *caspase*. *Caspase* ini yang menyebabkan sel mengalami apoptosis. Secara intraselular, apoptosis terjadi bila terjadi gangguan pada DNA (DNA *damage*). Gen p53 akan berlekatan dengan DNA tersebut dan akan mentranskrip gen yang

mengkode protein. Protein yang ditranskrip akan dikirim ke mitokondria dan mitokondria akan menghasilkan *Cytochrom C*. *Cytochrom C* yang berupa electron pembawa protein ini akan dilepas ke sitosol dan akan mengaktifkan adaptor protein. *Caspase* ini yang menyebabkan sel mengalami apoptosis.⁽⁵⁹⁾

2.2.4 Sel Kanker Skuamosa

Karsinoma sel skuamosa dapat tumbuh pada permukaan epitel maupun mukosa yang berupa *stratified squamous epithelium*. Biasanya tumor ini didahului dengan adanya actinic (solar) keratosis, yang merupakan *dysplasia* atau anaplasia dari *epidermal cell*.



Sel epitel normal

Sel kanker skuamosa

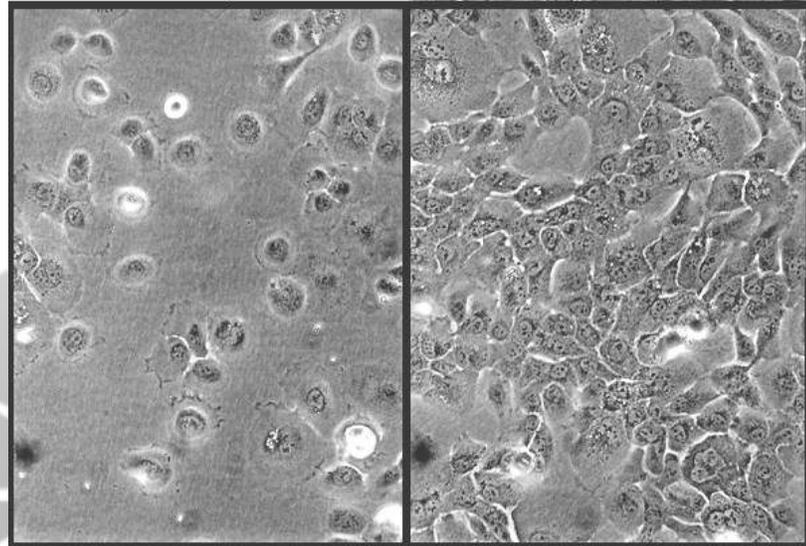
Gambar 2.4. Gambar sel epitel normal dan sel kanker skuamosa (pembesaran 10x)

Sumber: Skin Cancer Squamous Cell Carcinoma. [cited 12/12/08, pk 12.00]; Available from: <http://www.cancer.gov/>.

Penilaian tingkat keganasan karsinoma sel squamosa yang berdasarkan diferensiasi sel tumor dan jumlah mitosis tumor diklasifikasikan berdasarkan Broder's Grade I, II, III, atau IV dengan peningkatan anaplasia.⁽¹⁴⁾

HSC-4 merupakan galur sel kanker skuamosa yang dibuat dari kanker skuamosa pada lidah manusia.^(60, 61) Galur sel ini dikultur dalam medium DMEM dengan 10% FBS, dengan 5% CO₂, temperatur 37°C dan tumbuh dalam satu lapisan menempel di dasar medium. Secara genetik, sel ini merupakan karsinoma sel

skuamosa pada lidah yang memiliki sifat seperti karsinoma sel skuamosa. HSC-4 memiliki rentan hidup yang tidak terbatas, dan terlihat seperti gambar 2.5, galur sel ini memiliki struktur morfologi seperti sel epitel.⁽⁶¹⁾



Satu hari setelah disubkultur

Sebelum dipanen

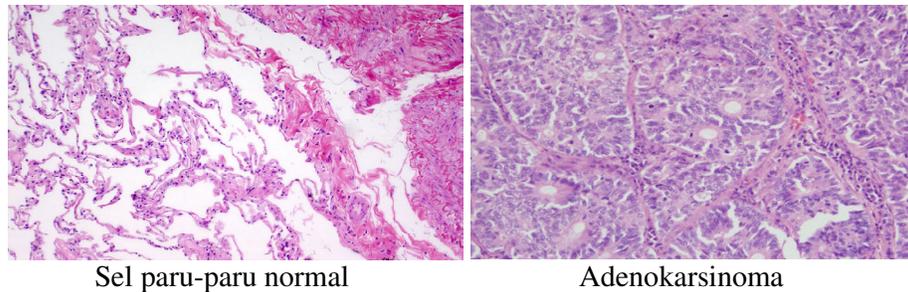
Gambar 2.5. HSC-4 dengan perbesaran 10x

Sumber: JCRB0624 [HSC-4]. Jakarta; [cited 22/9/08, 9:36]; Available from:

http://cellbank.nibio.go.jp/cgi-bin2/str2/str_search.cgi?cellno=JCRB0624&lotno=112796

2.2.5 Adenokarsinoma paru-paru

Adenokarsinoma adalah jenis tumor ganas yang berasal dari struktur kelenjar. Adenokarsinoma paru-paru, merupakan jenis kanker paru-paru yang dapat menyerang perokok maupun non-perokok. Kanker ini cepat untuk bermetastasis. Tujuh puluh hingga delapan puluh persen penderita adenokarsinoma paru-paru didiagnosa telah terjadi metastasis ke bagian tubuh lain. Dan hanya sepuluh persen penderita dapat bertahan selama lima tahun setelah didiagnosa.⁽⁴⁾



Sel paru-paru normal

Adenokarsinoma

Gambar 2.6. Gambar sel normal paru-paru dengan sel adenokarsinoma paru-paru (pembesaran 10x).

Sumber: Lung Adenokarsinoma. [cited 12/12/08, pk 12.00]; Available from: <http://www.cancer.gov/>.

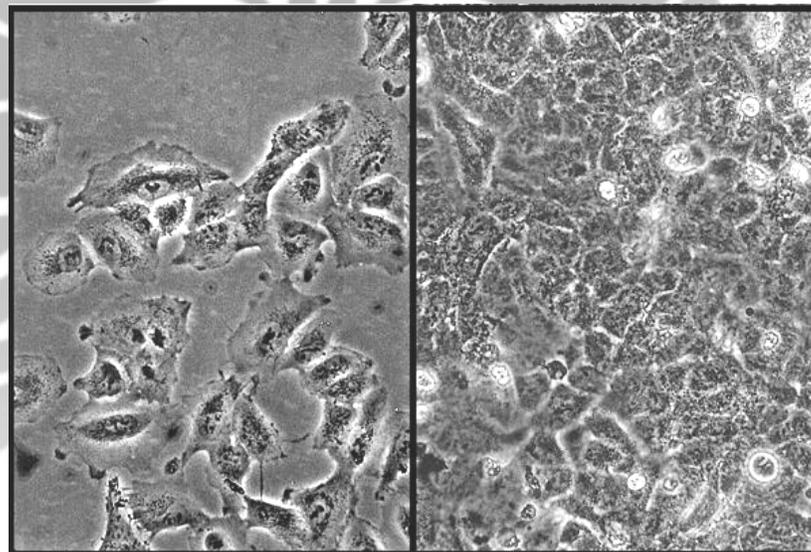
Kanker paru-paru biasanya menyerang sel epitel paru-paru. Ada 2 kategori kanker paru-paru; *Small Cell Lung Cancer* (SCLC) dan *Non-Small Cell Lung Cancer* (NSCLC). NSCLC biasanya menyebar lebih lama daripada SCLC. NSCLC tumbuh perlahan, menyerupai jaringan normal sekitar, dan dapat bermetastasis ke bagian tubuh lain.⁽⁴⁾ Karsinoma sel skuamosa, adenokarsinoma, dan large cell carcinoma adalah beberapa contoh dari NSCLC yang dapat terjadi pada paru-paru manusia.⁽⁶²⁾ Bentuk sel dari adenokarsinoma paru-paru adalah glandular.⁽⁴⁾ NSCLC, yang biasanya disebut juga *oat cell cancer*, terjadi sebanyak 20% dari semua kanker paru-paru. NSCLC biasanya dirawat dengan bedah, tetapi SCLC biasanya lebih berespon pada kemoterapi dan radiasi karena lebih cepat tumbuh dan bermetastasis.

Penyebab umum dari kanker paru-paru adalah penggunaan lama dari rokok tembakau. Penyebab kanker paru-paru lainnya, yang hanya menjangkit 10% dari kasus, karena adanya kombinasi antara faktor genetik, gas radon, asbestosis, dan polusi udara.⁽⁵³⁾

A-549 merupakan galur sel adenokarsinoma paru-paru yang dibuat dari kanker paru-paru pada manusia.^(63, 64) A-549 yang merupakan jenis adenokarsinoma ini memiliki keadaan kromosom aneuploid, dimana jumlah kromosomnya kurang dari sel normal.

Universitas Indonesia

Galur sel ini dikultur dalam medium D-MEM dengan 10% FBS, dalam 5% CO₂, temperatur 37°C. Dalam medium kultur, A-549 akan mensintesis *pulmonary surfactant* yang merupakan komposisi lipid, protein dan karbohidrat. Dalam keadaan normal, *pulmonary surfactant*, yang disintesis oleh sel pneumosit tipe II ini, akan melindungi alveoli paru-paru. Perbedaan sel pneumosit tipe I dan tipe II ini berada pada bentuk dan kemampuannya, dimana secara berturut-turut berbentuk rata dan tidak menghasilkan sekret serta kuboidal dan menghasilkan sekret *pulmonary surfactant*.^(44, 63) Galur sel ini memiliki rentan hidup yang tidak terbatas, dan memiliki struktur morfologi seperti sel epitel yang tumbuh dalam satu lapisan pada dasar medium seperti gambar 2.7.^(63, 64)



Satu hari setelah disubkultur

Sebelum dipanen

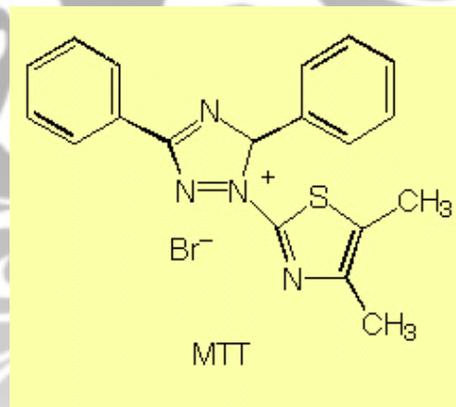
Gambar 2.7. dengan perbesaran 20x

Sumber: JCRB0624 [HSC-4]. Jakarta; [cited 22/9/08, 9:36]; Available from: http://cellbank.nibio.go.jp/cgi-bin2/str2/str_search2.cgi?cellname=A549&lotno=

2.4 Viabilitas Sel sebagai Indikator Sitotoksitas

Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup. Viabilitas sel menunjukkan respon sel jangka pendek, seperti perubahan permeabilitas membran atau adanya gangguan pada jalur metabolisme tertentu dalam sel⁽⁴⁴⁾. Oleh karena itu, viabilitas sel sering digunakan sebagai penanda sitotoksitas suatu material.⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ Tes sitotoksitas ini berguna untuk mengetahui sifat biologis suatu bahan apakah bersifat toksik terhadap sel tertentu atau tidak.⁽⁴⁴⁾

Salah satu yang mengindikasikan sitotoksitas suatu bahan adalah adanya penurunan proliferasi sel dan penurunan viabilitas sel.⁽⁵⁰⁾ Salah satu tes sitotoksitas yang sering digunakan untuk menguji viabilitas sel adalah 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay atau yang lebih dikenal dengan MTT assay.



Gambar 2.8: Struktur bangun MTT

Sumber: MTT assay. Journal [serial on the Internet]. Date [cited 2002 Januari]:

Available from:

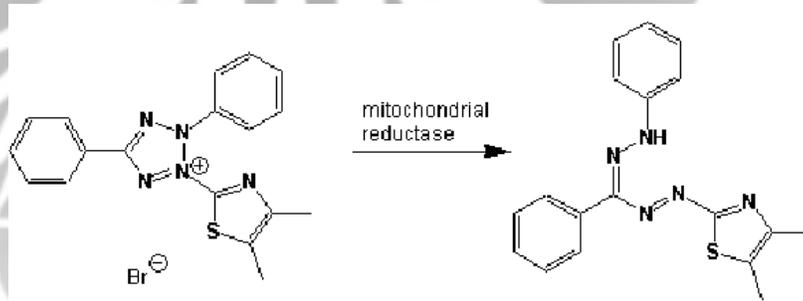
<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=3%2d%284%2c5%2dDimethylthiazol%2d2%2dy1%29%2d2%2c5%2ddiphenyltetrazolium%2dbromide>.

Pertama kali, MTT assay dikenalkan oleh Mosmann pada tahun 1983. Secara fisik, MTT ini merupakan bahan kimia yang berwarna kuning dan dapat larut dalam air.^(68, 69) Bubuk MTT ini

sensitif terhadap panjang gelombang tertentu, terutama cahaya. Oleh sebab itu, tahap persiapan harus dilakukan seminimal mungkin terkena cahaya. Pembuatan larutan biasanya dilakukan sesaat sebelum dipaparkan ke sel.^(69, 70) Struktur kimia MTT dapat dilihat pada Gambar 2.8.

Prinsip dasar MTT assay adalah mengukur aktivitas seluler berdasarkan aktivitas *succinic dehydrogenase* mitokondria sel untuk mereduksi garam methylthiazol tetrazolium (MTT).⁽⁶⁸⁾ Aktivitas seluler yang diukur akan berbanding lurus dengan nilai absorpsi dan konsentrasi sel yang digunakan.⁽⁶⁸⁾

Pada proses metabolisme, sel-sel yang hidup akan menghasilkan enzim *succinic dehydrogenase* mitokondria. Enzim ini akan bereaksi dengan garam methylthiazol tetrazolium (MTT) dan membentuk kristal formazan ungu yang intensitasnya sebanding dengan aktivitas sel yang hidup, dengan reaksi seperti pada Gambar 2.9.⁽⁶⁹⁻⁷⁴⁾



Gambar 2.9. Reduksi yang terjadi pada mitokondria

Sumber: MTT assay. Journal [serial on the Internet]. Date [cited 2002 Januari]:

Available from:

<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=3%2d%284%2c5%2dDimethylthiazol%2d2%2dyl%29%2d2%2c5%2ddiphenyltetrazolium%2dbromide>

Kristal formazan ungu bersifat tidak permeabel pada membran sel dan tidak larut dalam air.^(29, 75, 76) Kristal ini akan terakumulasi dalam sel yang sehat⁽⁷²⁾. Oleh karena itu, diperlukan

Universitas Indonesia

pelarut tambahan seperti isopropanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) atau larutan deterjen sodium dodecyl sulfate (SDS) yang diencerkan dalam asam hidroklorida (HCl).⁽⁷²⁻⁷⁴⁾ Jumlah sel yang hidup akan sebanding dengan jumlah formazan yang dihasilkan.⁽⁷²⁾

Nilai absorbansi (OD) dari kristal formazan yang telah dilarutkan dapat diukur menggunakan spektrofotometer (ELISA reader)⁽⁶⁸⁾ dengan panjang gelombang antara 550-570 nm.⁽⁷⁷⁾ Selanjutnya, viabilitas dinyatakan dengan membandingkan nilai absorbansi kelompok perlakuan yang dipaparkan bahan uji dengan kelompok kontrol (sample tanpa bahan uji) menggunakan rumus dari *In Vitro Technologies* sebagai berikut:⁽⁷⁸⁾

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}} \times 100\%$$

Rumus 2.1. Rumus persentase viabilitas sel.

Jika perhitungan viabilitas sel lebih rendah dari 100%, maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dikatakan bersifat toksik.⁽⁷⁸⁾

2.5 Kerangka Teori

