

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut (KSSRM)

Sebanyak 91% dari seluruh kanker rongga mulut adalah KSSRM.² KSSRM merupakan bagian dari kanker di daerah kepala dan leher yang menempati peringkat 10 kanker terbanyak di dunia dengan distribusi geografis yang luas¹ dan secara signifikan menyebabkan morbiditas-mortalitas¹². Berbagai literatur memperlihatkan variasi klasifikasi yang dipakai untuk menggambarkan kanker mulut sehingga menyulitkan untuk menginterpretasikan data epidemiologinya. Biasanya kanker mulut didefinisikan sebagai kanker yang berasal dari seluruh mukosa rongga mulut, tonsil, faring dan laring tetapi tidak termasuk kanker yang berasal dari bibir.

2.1.1 Etiologi

Insidensi KSSRM yang tinggi³ dan bervariasi di lokasi dan kelompok etnik yang berbeda² berhubungan langsung dengan kebiasaan yang merupakan faktor resiko kanker mulut seperti penggunaan tembakau, menyirih dan konsumsi alkohol.³

Tembakau mengandung karsinogen yang potensial meliputi *nitrosamines (nicotine)*, *polycyclic aromatic hydrocarbons*, *nitrodictanolamine*, *nitrosoproline*, dan *polonium*. Asap tembakau mengandung karbonmonoksida, *thiocyanate*, *hydrogen cyanide*, *nicotine* dan metabolit dari kandungan ini.⁴ Sebanyak 80% pasien kanker mulut adalah perokok.¹³ Prevalensi konsumsi tembakau telah menurun di negara maju, namun pada negara dengan pendapatan rendah atau sedang pengonsumsi tembakau semakin meningkat, khususnya di antara remaja dan wanita.³ Lebih dari 250 juta penduduk Asia Tenggara menggunakan *smokeless tobacco*; 95% berada di India dan Bangladesh (13%), sementara di Indonesia distribusi pengguna *oral tobacco* sebesar 0,8% dari 212 juta penduduk (WHO). Di India, jumlah diagnosa kanker

yang berhubungan dengan penggunaan tembakau diperkirakan 250.000 kasus per 700.000 hingga 900.000 dari kanker yang terdiagnosa (2001).¹³

Semua bentuk alkohol dapat menyebabkan kanker mulut, termasuk alkohol yang terkandung di dalam *mouthwash*. Dalam karsinogenesis, alkohol dapat berperan secara independen dan bereaksi sinergis dengan tembakau dengan memberikan efek dehidrasi pada mukosa sehingga meningkatkan permeabilitas mukosa. Telah diperkirakan bahwa perokok menggunakan *mouthwash* lebih sering.⁴ Faktor lain yang juga berperan dalam terjadinya KSSRM meliputi kebiasaan menyirih, pajanan sinar UV, faktor nutrisi, faktor genetic, infeksi *Human Papilloma Virus*, *Herpes Simplex Virus* dan *Candida*.

2.1.2 Patogenesis

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut terjadi akibat adanya proses perubahan sel yang bertahap dari normal menjadi lesi displastik hingga akhirnya menjadi karsinoma sel skuamosa. Lesi premalignansi atau prekanker didefinisikan oleh WHO sebagai jaringan yang berubah secara morfologis. Lesi yang termasuk dalam klasifikasi ini adalah leukoplakia dan eritroplakia, sedangkan lichen planus lebih diklasifikasikan sebagai suatu kondisi dengan potensi menjadi malignan.¹²

Secara histopatologis, lesi premalignan dapat memperlihatkan adanya displasia dengan kategori dengan ringan, sedang dan berat. Berdasarkan kriteria histomorfologis displasia ringan memiliki sel displastik yang terbatas pada lapisan basal epitelium, sementara perubahan pada displasia sedang dan berat meliputi perubahan morfologi seluler dan peningkatan ketebalan lapisan epitel sebanyak 2/3 sampai 3/4 ketebalan lapisan epitel. *Carcinoma in-situ* adalah lesi di mana sel abnormal meliputi seluruh epitel tanpa menginvasi membran dasar. Suatu KSSRM didiagnosis ketika terdapat kerusakan membran dasar dan invasi sel epitel displastik menuju jaringan ikat. keberadaan dan

keparahan displasia diperkirakan berhubungan dengan peningkatan resiko ke arah keganasan.¹²

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut dapat berkembang di tempat yang sebelumnya terdapat leukoplakia dan eritroplakia atau dapat berkembang secara *de novo*. Secara klinis, lesi memiliki tampilan lesi prakanker pada tahap awal karsinogenesis. Ketika telah menginvasi submukosa, KSSRM tampak sebagai ulserasi kronis yang ireguler, dengan tepian yang meninggi dan terdapat indurasi.¹²



Gambar 2.1 Karsinoma sel skuamosa tahap lanjut pada lidah dan dasar mulut dengan metastasis mencapai nodus limfa regional (Gambar diambil dari: Silverman S, Eversole LR, Truelove EL. Essential of oral medicine. London: Bc Decker inc; 2001.)

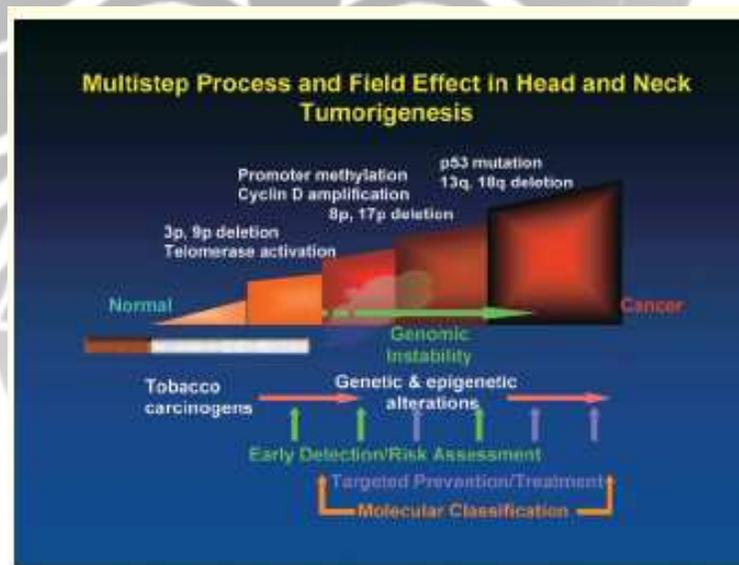
Seperti kanker di tempat lain, KSSRM dikelompokkan secara klinis sebagai dasar pembuatan rencana perawatan. Sistem staging yang digunakan merupakan klasifikasi tumor-nodemastasis (TNM). Dimana T menunjukkan ukuran tumor, N menggambarkan ada atau tidaknya lesi yang bermetastasis ke nodus limfa dan M menunjukkan ada atau tidaknya metastasis yang jauh ke beberapa organ atau lokasi, lokasi yang paling sering terkena adalah paru-paru.¹²

2.1.3 Aspek molekuler pada karsinogenesis KSSRM

Karsinogenesis merupakan proses genetik yang memicu perubahan morfologi dan tingkah laku seluler. Analisis perubahan di tingkat molekuler dapat menjadi alat diagnosis utama dan pemandu untuk melakukan perawatan, karena perubahan morfologis terjadi setelah adanya perubahan genetik.⁴

Kanker mulut dan lesi prakanker berkembang sebagai akibat dari siklus sel yang tidak terkontrol yang dikarenakan *multiple mutations*. *Proto-oncogene*, TSG, dan molekul *gatekeeper* (*cyclins* dan CDK) merupakan kelompok gene DNA perbaikan yang dapat bermutasi di karsinoma sel skuamosa.¹² Dalam menonaktifkan TSG dibutuhkan *loss of heterozygosity* (LOH) atau *two-hit-hypothesis* (knudson's *hypothesis*) yang menyatakan bahwa dalam inaktivasi TSG, kedua alel harus bermutasi^{4, 14, 15}. Pada KSSRM, LOH dilaporkan terjadi pada kromosom 3p, 4q, 9p, 11q dan 17p.⁴

Pada sel epitel normal, lesi dengan perubahan histologis ringan, seperti hiperplasia dan displasia ringan, delesi satu dari dua alel pada kromosom 3p dan 9p21 adalah kejadian yang paling sering terjadi. Namun delesi ini dapat juga mempengaruhi terjadinya transformasi menuju keganasan karena pada regio kromosom 3p14 dan 9p21 terdapat TSG.⁴



Gambar 2.2 Diagram patogenesis molekuler kanker pada kepala dan leher.
(Gambar diambil dari: *Focus on Head and Neck Cancer*, *Cancer Cell*, April 2004)

Pada lesi kanker, proses siklus sel menjadi tidak terkontrol. Peningkatan dalam siklus sel biasanya merupakan akibat dari banyaknya mutasi yang terjadi pada berbagai gen yang mengatur pembelahan sel.

Banyak dari kelainan molekuler ini, terutama delesi DNA dan amplifikasi gen, adalah akibat dari ketidakstabilan genomik. Memahami mekanisme ketidakstabilan genomik akan menciptakan strategi preventif atau terapeutik dalam mencegah atau mengurangi ketidakstabilan tersebut⁵

2.2 p53

p53 merupakan TSG yang beraksi sebagai pertahanan utama melawan kanker^{6,7}. *Tumor suppressor gene* (TSG) adalah gen pengkode protein yang memiliki efek negatif dalam pembelahan sel dengan menghambat siklus sel saat kerusakan DNA terjadi. Kerusakan ini dapat berkembang sebagai konsekuensi dari pemaparan karsinogen atau infeksi oleh virus onkogenik. Jika kerusakan parah dan tidak dapat diperbaiki, protein TSG akan menekan sel sehingga mencapai kematian sel terprogram atau apoptosis.¹²

Pada sel yang tidak mengalami tekanan, p53 dijaga dalam level yang sangat rendah dengan berikatan pada MDM2 yang beraksi sebagai *ubiquitin ligase*, hal ini memfasilitasi degradasi p53.¹⁷ Apabila terjadi kerusakan DNA, p53 dengan cepat berakumulasi dan teraktivasi, kemungkinan karena respon *double strand breaks* yang diinduksi oleh agen genotoksik. Beberapa proses lain yang dapat mengaktivasi p53, adalah fosforilasi, glikosilasi, keberikatan pada protein regulatorik, alternative splicing dan asetilasi.¹⁸

Aktivasi p53 memiliki dua hasil yaitu penghentian pertumbuhan atau apoptosis. Beberapa faktor turut mempengaruhi pilihan respon sel yang terjadi, termasuk diantaranya adalah tipe sel, ada tidaknya faktor survival pada lingkungan luar, tingkat kerusakan DNA dan level p53¹⁸.

Abnormalitas TSG telah dilaporkan pada semua jenis kanker dan mutasi p53 (mutant p53) ditemukan terdapat pada hampir 50% kanker⁹ dan sebagian besar KSSRM. Mutasi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas p53 atau dengan hilangnya sinyal sel secara *upstream* atau *downstream* terhadap p53.^{19, 20} Hilangnya kemampuan p53 menyebabkan imortalisasi sel dan memberikan kecenderungan sel untuk bertransformasi menjadi neoplasma.¹⁰

Selain mutasi pada p53, dilaporkan juga adanya *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada kodon 72 dengan substitusi asam amino. Tipe 72P dari CCC mengkode proline dan tipe 72R dari CGC mengkode arginine. Tipe 72P dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan 72R.⁹

Pada sel galur KSSRM HSC-3 dan HSC-4 ditemukan mutasi p53 dengan sifat yang berbeda. Pada HSC-3 ditemukan mutasi berupa insersi 4 pasang basa TAAG di kodon 305-306 dan memiliki SNP 72P. HSC-4 memiliki mutasi berupa *missense mutation* pada kodon 248 dan memiliki SNP 72R. *Missense mutation* menghasilkan penurunan aktivitas pengikatan DNA dan hilangnya berbagai fungsi yang dimediasi oleh transkripsi gen p53. Konsekuensinya, sel bertransformasi menuju keganasan dan terlibat di dalam immortalisasi, bertambahnya perbanyakan sel dan ketidakstabilan kromosom DNA.⁹

Tabel 2.1 Analisis Mutasi p53 dan SNP pada kodon 72

Sel galur	Ekson	Kodon	Perubahan basa (asam amino)	Mutasi	SNP pada kodon 72
HSC-3	8	305-306	Insersi TAAG	Insersi 4bp	CCC (P)
HSC-4	7	248	CGG(R)→CAG (Q)	Missense	CGC (R)

Telah diolah kembali dari Kamiya Y, Ohshima T. The Individual Cell Properties of Oral Squamous Cell Carcinoma and p53 Tumor Suppressore Gene Mutation. *Oral Science International*.2005:104-17.

Variasi mutasi p53 mencerminkan keragaman sifat individual kanker yang diperoleh. Berdasarkan penelitian Yoko Kamiya dan Tomoko Ohsima, terdapat perbedaan ekspresi level protein p53 yang diukur menggunakan ELISA pada HSC-3 dan HSC-4. Pada HSC-3, tidak terdapat ekspresi protein p53 atau dapat diklasifikasikan sebagai p53 (-), sebaliknya ekspresi protein p53 yang tinggi nampak pada HSC 4 dan diklasifikasikan sebagai p53 (+).⁹

2.3 Telomer dan Telomerase

Setiap kromosom eukariotik terdiri dari molekul tunggal DNA yang berhubungan dengan berbagai protein. Molekul DNA pada kromosom eukariotik adalah linear dan memiliki dua ujung. Molekul DNA dari kromosom mengandung kumpulan linear gen-gen yang mengkode protein dan RNA yang bercampur dengan noncoding DNA. Noncoding DNA terdiri dari daerah panjang (*long stretches*) yang membangun sentromer dan telomer²¹

Telomer merupakan bagian yang penting dalam kehidupan sel.²¹ Peranan telomer adalah untuk melindungi kromosom dari degradasi, rekombinasi, atau fusi dan untuk mencegah ujung kromosom terdeteksi sebagai untaian yang lepas²² sehingga mampu menjaga integritas dan kestabilan *genome*.⁶ Telomer pada sebagian besar eukariota diketahui terdiri dari pengulangan rangkaian TTAGGG dan protein.²³

Dalam setiap pembelahan sel telomer akan memendek 50-200 *base pairs* karena DNA *polymerases* tidak mampu mereplikasi 3' termini secara utuh, fenomena ini dinamakan '*the end of replication problem*'.²⁴ Saat telomer menjadi sangat memendek, fungsi perlindungan telomer dipertanyakan, telomer yang disfungsi dikenal sebagai DNA rusak yang memicu penghentian pertumbuhan permanen yang dikenal sebagai *replicative senescence*.²⁵ *Senescent* adalah keadaan dimana terjadi penghentian siklus sel pada fase G1²⁶, sehingga sel tidak lagi berproliferasi namun tetap dapat hidup untuk periode yang lama.²⁷ *Senescence* yang diinduksi oleh pemendekan telomer menekan insidensi kanker seefektif apoptosis dan kejadian ini dimediasi oleh p53.²⁴ Mutasi p53 dapat menyebabkan sel kehilangan kemampuan untuk menjalani *senescence*^{6, 26} sehingga pemendekan telomer terus berlanjut hingga sel memasuki hambatan untuk berproliferasi kedua yang dinamakan *crisis*. Normalnya, setelah periode *crisis*, sel akan mati.²⁷

Pada tahun 1985, Greider dan Blackburn mengumumkan penemuan enzim telomerase yang memperpanjang DNA²⁸ dengan menambah *telomer* (TTAGGG) *repeate* pada ujung kromosom.²⁹ Segera setelah ditemukan, keberadaan telomerase didokumentasikan terdapat pada sebagian besar sel kanker.²⁴ Aktivitas telomerase juga ditemukan pada sel yang aktif membelah

dan memperbarui diri seperti keratinosit, lapisan basal epidermis dan sel hematopoietik untuk menjaga fungsi sel stem mereka.³⁰

Pada sel normal yang diberikan perlakuan sehingga menunjukkan aktivitas telomerase yang meningkat, pada akhirnya mengalami beberapa kali mitosis tanpa adanya pemendekan telomer^{21, 31}, membelah secara dahsyat³¹ dan menghindari *senescence*.^{31, 32} Hal ini menunjukkan bahwa telomerase dan pemeliharaan telomer adalah kunci immortalisasi sel¹¹ dan proliferasi tidak terbatas.³³ Aktivitas telomerase nampak pada sebagian besar tumor manusia (85%)²⁷, namun tidak pada jaringan yang berdekatan dengan tumor, sehingga banyak penelitian yang berfokus pada pengembangan metode diagnosis menggunakan telomerase dan terapi anti-telomerase.³³

Telomerase merupakan *RNA-dependent DNA polymerase* yang memiliki inti yang terdiri dari subunit RNA yaitu human telomerase RNA (hTER), komponen protein (human telomerase associated protein 1-hTEP1) dan subunit katalis *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT).^{34, 35} Dari subunit ini, aktivitas telomerase membutuhkan adanya hTER, yang merupakan RNA template dari *telomeric repeat*, dan hTERT yang merupakan *reverse transcriptase*.^{34, 36}

2.4 Human Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT)

Gen hTERT atau subunit katalitik telomerase, berlokasi di 5p15.33. Gene hTERT terdiri dari 16 ekson dan 15 intron sepanjang ~35kb.³² dan mengkode 7 isoform protein³⁷, salah satunya adalah protein hTERT yang merupakan komponen kunci yang mengontrol aktivitas telomerase^{10, 32}. Protein hTERT memiliki berat molekul 127 kD.³⁸

Stem sel embrionik manusia mengekspresikan gen TERT dan TR dan menunjukkan aktivitas telomerase. Pada awal kehidupan, hTERT memiliki peranan dalam pluripotensi sel stem embrionik, regulasi siklus sel, dan kapasitas diferensiasi secara *in vitro*. Namun selama proses diferensiasi TERT, TR, dan telomerase ditekan.³⁹ Pada kebanyakan sel epitel normal, ekspresi hTERT terbatas pada sel induk dan keturunan terdekatnya.⁴⁰

Investigasi mengenai mekanisme aktivasi dan represi transkripsi hTERT pada kanker dan sel normal telah menjadi area yang menarik dalam penelitian kanker. Beberapa faktor transkripsi, meliputi produk onkogen dan TSG, mampu memengaruhi transkripsi hTERT. Sebagian besar pengatur transkripsi hTERT masih terbukti sebagai pengatur endogen atau fisiologis, namun ditemukan juga bahwa faktor transkripsi *c-myc* dapat menyerang langsung hTERT saat *c-myc* berekspresi berlebih.⁴⁰

Promoter hTERT memiliki beberapa *binding site* untuk faktor transkripsi Sp1. Mutasi *binding site* ini secara dramatis menurunkan aktivitas promoter hTERT pada sel kanker, menunjukkan bahwa Sp1 berkontribusi dalam transkripsi hTERT. Sp1 dapat berinteraksi dengan protein lain, salah satunya adalah p53 untuk meregulasi negatif transkripsi hTERT pada sel normal. p53 yang berikatan dengan Sp1 menghambat Sp1 berikatan dengan promoter hTERT. Inaktivasi p53 memainkan peranan penyebab aktivasi hTERT pada karsinogenesis selama perubahan dari sel normal dengan telomerase negatif menjadi sel kanker dengan telomerase positif.⁴⁰

Peranan p73 dalam pemeliharaan telomer dan pengaturan hTERT masih harus diselidiki. Ekspresi p73 α dan p73 β memberikan hasil yang berbeda. P73 α menekan promoter hTERT serupa dengan yang diobservasi pada p53, sedangkan p73 β tidak menghasilkan penekanan hTERT secara konsisten. Hal ini mengindikasikan bahwa isoform p73 memiliki efek yang berbeda dalam ekspresi hTERT⁸

Protein hTERT mempengaruhi transformasi keganasan sel⁴¹, namun ekspresi hTERT tidak berhubungan dengan tingkat keganasan tumor yang berdasarkan ukuran, *grade*, atau status nodal.³⁴ Beberapa sel yang aktivitas telomerasenya rendah, pada sisi lain dapat memiliki level transkripsi hTERT yang tinggi. Pada kasus ini, regulasi level *alternative splicing* memicu melepas ekson yang mengkode fungsi *reverse transcriptase*, sehingga produk translasi tidak akan memberikan enzim yang aktif.²⁸

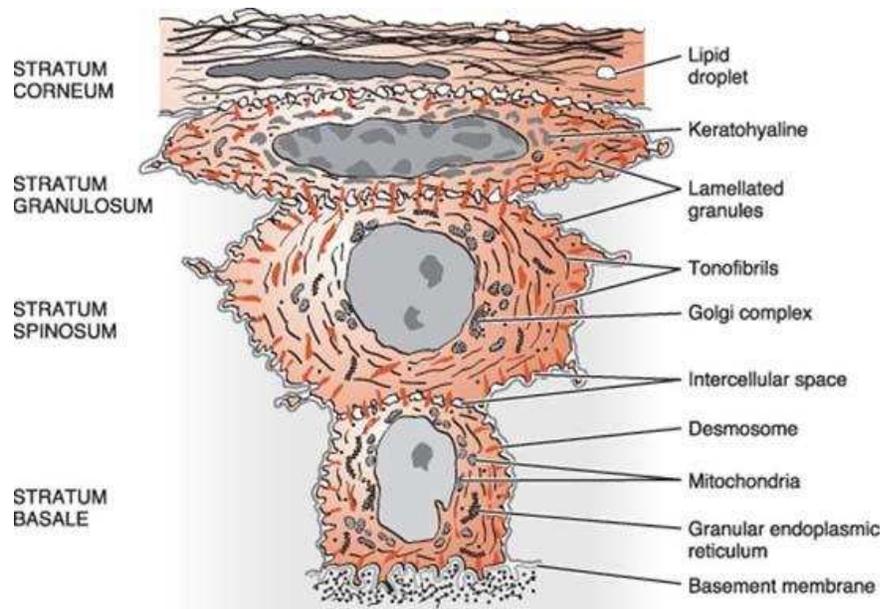
Level hTERT yang rendah dideteksi dengan *real-time* RT-PCR pada sebagian besar jaringan mukosa oral normal dan ekspresi hTERT juga terdeteksi pada sebagian jaringan karsinoma sel skuamosa dengan kenaikan

yang signifikan. Dengan *in situ* RT-PCR, ekspresi hTERT tidak terlihat pada epitelium normal atau *mild dysplasia* namun terdeteksi pada *moderate dysplasia* dengan histopatologi dengan level yang lebih tinggi: *severe dysplasia* dan *invasive carcinoma*. Hal ini mengindikasikan bahwa peningkatan ekspresi telomerase terjadi mulai dari karsinogenesis rongga mulut manusia dan mendukung peranan penting telomerase dalam perkembangan kanker mulut manusia. Banyaknya kuantitas transkripsi hTERT yang terdeteksi pada spesimen jaringan normal dapat juga dikarenakan adanya sel keratinosit rongga mulut dan hematopoietik yang menampakkan level aktivitas telomerase untuk menjalani replikasi, diferensiasi dan regenerasi sel yang konstan.⁴²

2.5 Jaringan Gingiva

Gingiva merupakan bagian dari mukosa mulut yang melindungi prosesus alveolaris pada rahang dan mengelilingi daerah sekitar leher gigi. Secara anatomis, gingiva terbagi menjadi tipe *marginal*, *attached*, dan area interdental. Gingiva terdiri dari jaringan epitel skuamosa berlapis, ada tiga area berbeda berdasarkan morfologi dan fungsinya: *oral* atau *outer epithelium*, *sulcular epithelium*, dan *junctional epithelium*.⁴³

Gingiva mempunyai lapisan karakteristik dari epitelium skuamosa, yang terdiri dari sel yang berlekatan sangat erat satu sama lain dan tersusun dalam lapisan yang berbeda yang disebut strata⁴⁴ yaitu (1) Sel basal atau sel formatif dari lapisan sel kolumnar atau kuboidal, (2) Sel prickle atau lapisan spinosa dari sel-sel poligonal, (3) Lapisan granular (*stratum granulosum*) di mana sel-selnya datar dan mengandung banyak partikel keratohialin, (4) Lapisan kornifikasi (*stratum korneum*) dimana sel-selnya datar dan tenggelam, dan terkeratinisasi atau parakeratinisasi.⁴⁵ Tipe sel yang paling penting pada epitel gingiva yaitu keratinosit. Sel-sel lain yang ditemukan dalam epitel yaitu nonkeratinosit yang termasuk di dalamnya sel-sel langerhans, sel merkel dan melanosit⁴³



Copyright © 2002, W.B. Saunders Company

Gambar 2.3 Gambaran sel dari berbagai lapisan epithelium skuamosa dilihat menggunakan mikroskop electron

Gambar diambil dari . Newman MG, Takei HH, FA Cs, editors. Carranza's Clinical Periodontology. 9th ed: WB. Saunders Co.; 2002.

2.5.1 Komponen Molekuler Jaringan Gingiva

Sitoskeleton merupakan suatu jaringan protein kompleks yang bertindak sebagai "tulang dan otot" bagi sel.⁴⁶ Secara morfologis, sitoskeleton pada sel epitel terdiri dari tiga komponen yang berbeda yaitu mikrofilamen, filamen intermediat, dan mikrotubulus.⁴⁷

Komponen protein yang terdapat di dalam mikrofilamen adalah *actin*, *myosin*, dan protein yang berhubungan seperti *tropomyosin*, *troponin*, *α actinin* dan *filamin*. Mikrotubulus berperan penting dalam mengkoordinasikan sejumlah gerakan sel. Di dalam mikrotubulus, protein yang dominan adalah tubulin.⁴⁷ Filamen intermediat merupakan unsur penting pada sel yang sering mendapatkan stres mekanik. Berbeda dengan unsur-unsur sitoskeleton lain, filamen dalam filamen intermediat adalah struktur yang sangat stabil. Tidak terdapat bukti adanya kelompok protein filamen intermediat dapat terurai dan tersusun secara reversibel. Secara umum, hanya dijumpai satu jenis filamen intermediat pada suatu

jenis sel tertentu.⁴⁶ Pada sel epitel, filamen yang ditemukan adalah filamen keratin.^{46,47}

Jaringan merupakan kelompok-kelompok sel yang menyatu, hal ini membutuhkan kemampuan sel agar mampu berlekatan dengan sel-sel lainnya dengan mekanisme adhesi sel. Fibronektin menghasilkan perlekatan pada fibroblas.⁴⁷ Penurunan jenis protein ini dijumpai pada jenis tertentu sel-sel kanker, yang mungkin menjadi penyebab mengapa sel kanker tidak melekat erat satu sama lain, tapi cenderung memisah dan bermetastasis.⁴⁶

2.6 Protein

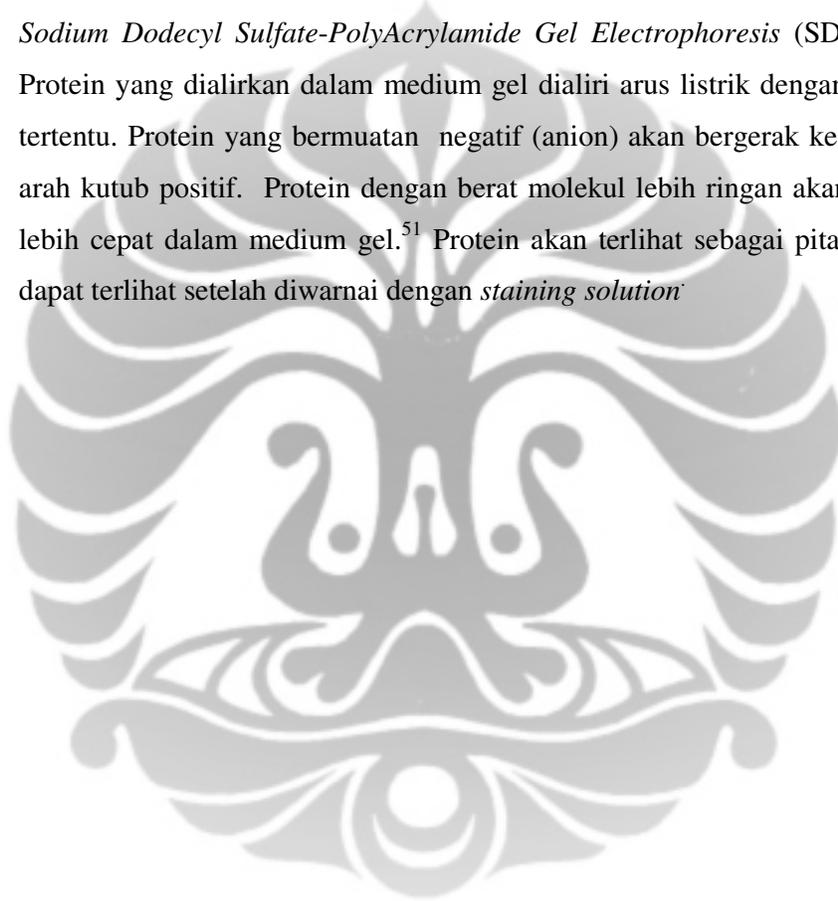
Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari satu atau beberapa polipeptida yang terdiri dari rangkaian asam amino yang saling berikatan.⁴⁸ Setiap protein memiliki fungsi khas yang dibutuhkan untuk struktur, fungsi dan regulasi dari sel-sel tubuh, jaringan dan organ. Protein merupakan penyusun dari material sel dan dapat berperan sebagai enzim, hormon, elemen struktural dan antibodi.⁴⁹

Struktur protein dapat dilihat sebagai hirarki berupa struktur primer (tingkat satu), sekunder (tingkat dua), tersier (tingkat tiga), dan kuartener (tingkat empat). Struktur primer protein merupakan urutan asam amino penyusun protein yang dihubungkan melalui ikatan peptida (amida). Sementara itu, struktur sekunder protein adalah struktur tiga dimensi lokal dari berbagai rangkaian asam amino pada protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen.⁴⁸

Bradford protein assay merupakan prosedur analisis spektroskopik yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam cairan. Penilaian tersebut berbeda-beda tergantung dari komposisi asam amino dari protein yang dinilai. *Spectrometer* digunakan untuk memproduksi sinar dengan panjang gelombang dan *photometer* untuk menerima dan menilai intensitas cahaya. Pada metode Bradford terkandung *dye* Coomassie® Brilliant Blue yang dapat berikatan dengan protein dalam cairan asam yang memiliki tingkat penyerapan dari 465 nm sampai 595 nm. Sinar yang ditembakkan oleh

spectrometer sebagian diserap oleh protein dan sebagian diterima oleh *photometer*. Alat tersebut menghantarkan sinyal tegangan ke galvanometer yang berubah sebanding dengan perubahan jumlah sinar yang diserap sehingga kemudian menunjukkan angka konsentrasi dari protein yang diukur. Kelebihan *Bradford protein assay* dibandingkan metode yang lain adalah lebih cepat, langkah-langkah pencampuran lebih sedikit, tidak membutuhkan pemanasan dan memberikan respons *colorimetric* yang lebih stabil.⁵⁰

Analisis profil protein dapat menggunakan metode yang dinamakan *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Protein yang dialirkan dalam medium gel dialiri arus listrik dengan tegangan tertentu. Protein yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak ke bawah ke arah kutub positif. Protein dengan berat molekul lebih ringan akan bergerak lebih cepat dalam medium gel.⁵¹ Protein akan terlihat sebagai pita-pita yang dapat terlihat setelah diwarnai dengan *staining solution*



2.7 Kerangka Teori

