

**HUBUNGAN EKSPRESI PROTEIN ERITROPOIETIN (EPO)
DENGAN PENINGKATAN JUMLAH SEL PADA JARINGAN
KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh:

FIRLI RAHMAH PRIMULA DEWI

0810910009-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**HUBUNGAN EKSPRESI PROTEIN ERITROPOIETIN (EPO)
DENGAN PENINGKATAN JUMLAH SEL PADA JARINGAN
KANKER PAYUDARA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

oleh:

FIRLI RAHMAH PRIMULA DEWI

0810910009-91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

LEMBAR PENGESAHAN

**Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (Epo) Dengan
Peningkatan Jumlah Sel Pada Jaringan Kanker Payudara**

oleh :
Firli Rahmah Primula Dewi
0810910009-91

**Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 20 Januari 2012
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi**

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Fatchiyah, M.Kes, Ph.D. **dr. M. Darwin Prenggono Sp.PD**
NIP. 196311271989032001 **196001181986011001**

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Widodo, SSi., Ph.D.Med.Sc
NIP. 197308112000031002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Firli Rahmah Primula Dewi
NIM : 0810910009-91
Jurusan : Biologi
Penulis skripsi berjudul :
Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (Epo) Dengan
Peningkatan Jumlah Sel Pada Jaringan Kanker Payudara
Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam daftar pustaka skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
 2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.
- Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Januari 2011
Yang menyatakan,

(Firli Rahmah Primula Dewi)
NIM. 0810910009-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seijin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (Epo) Dengan Peningkatan Jumlah Sel Pada Jaringan Kanker Payudara

Firli Rahmah PD, Fatchiyah, M. Darwin P

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi protein Epo pada jaringan kanker payudara dan mengetahui hubungan ekspresi protein tersebut dengan peningkatan jumlah sel kanker pada jaringan kanker. Jaringan kanker payudara stadium I,II,III dan IV dianalisis dengan imunohistokimia menggunakan antibodi primer *anti-Epo rabbit polyclonal* dan antibodi sekunder *Goat anti rabbit IgG rhodamine labelled*. Ekspresi protein Epo divisualisasi dan dianalisis dengan menggunakan mikroskop *Confocal Laser Scanning Microscope* (Olympus) dengan diukur tingkat perpendaran warnanya sesuai titik dimana pada kontrol HE dihitung jumlah selnya. Selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah sel pada jaringan kanker payudara yang telah diwarnai dengan Hematoxilin-Eosin (HE). Hasil penelitian menunjukkan bahwa intensitas ekspresi protein Epo/sel yang paling tinggi adalah pada stadium II (3.75 ± 2.02) dan intensitas Epo/sel yang paling rendah adalah pada stadium IV (2.64 ± 0.85). Berdasarkan hasil penelitian tersebut diduga bahwa respon sel terhadap hipoksia berbeda pada masing-masing stadium kanker, sehingga diketahui bahwa pada stadium II terjadi mekanisme pertahanan diri dari sel untuk mempertahankan dirinya pada kondisi hipoksia. Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sel diketahui bahwa nilai ekspresi Epo tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah sel pada jaringan kanker payudara.

Kata kunci: Antibodi, imunohistokimia, intensitas, kanker payudara, sel

Erythropoietin (Epo) Expression Related with the Increase Number of Cells In the Breast Cancer Tissue

Firli Rahmah PD, Fatchiyah, M. Darwin P

Biology Department, Faculty of Mathematic and Natural Sciences,
Brawijaya University, Malang

ABSTRACT

The aim of this study is to determine erithropoietin (Epo) expression correlated with the number of cancer cells in breast cancer tissue. To analyze the expression of Epo in breast cancer tissue at the 1st, 2nd, 3rd, and 4th stadium by using immunohistochemistry method with primary antibody (*anti-Epo rabbit polyclonal*) and secondary antibody (*Goat anti-rabbit IgG rhodamine labelled*). And then , to measure the Epo expression was visualized by using *Confocal Laser Scanning Microscope* (Olympus). To calculate the number of cells of breast cancer tissue which stained by Hematoxilin-Eosin (HE). The result of this experiment showed that Epo expression for each cells are differently on each cancer stadium, which the highest expression of Epo per cell is on the 2nd stadium (3.75 ± 2.02), and the lowest expression of Epo per cell is on the 4th stadium (2.64 ± 0.85). These data conducted that cell respons to Epo production was different at many stadium of cancer, indicated that on 2nd stadium there is a mechanism self-defense of cancer cells in respons to hypoxic conditions. Based on the number of cells, there is no correlation between Epo expressions with the total cells.

Keywords: antibody, immunohistochemistry, intensity, breast cancer, cells.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas rahmat, taufik, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Hubungan Ekspresi Protein Eritropoietin (Epo) Dengan Peningkatan Jumlah Sel Pada Jaringan Kanker Payudara". Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammmad SAW.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D dan Bapak dr. Darwin Prenggono SpPD KHOM selaku pembimbing skripsi, atas ilmu dan kesabaran dalam membimbing penyelesaian skripsi ini;
2. Bapak Widodo, Ph.D., Bapak Aris Soewondo M.Si dan Bapak Dr.Ir.M. Sasmito Djati MS selaku dosen penguji skripsi, atas saran, ilmu dan motivasinya untuk menjadi lebih baik;
3. Bapak Widodo, Ph.D selaku penasehat akademik selama kurang lebih 3 tahun, atas segala bimbingan, nasehat, serta kesabarannya dalam membimbing selama masa perkuliahan;
4. Ketua, dosen-dosen Jurusan Biologi, staf administrasi, dan laboran jurusan Biologi;
5. Staf administrasi dan analis Laboratorium Sentral Ilmu Hayati;
6. serta berbagai pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan demi penulisan karya-karya selanjutnya yang lebih baik. Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi para pembaca.

Malang, 20 Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Struktur Protein Eritropoietin.....	4
2.2 Struktur Protein Eritropoietin Reseptor.....	5
2.3 Sintesis Protein Epo oleh <i>Hypoksia Inducible-</i> <i>Factor (HIF-1)</i>	6
2.4 Sinyal Transduksi Epo dan EpoR.....	8
2.5 Metode Immunohistokimia.....	10
2.6 Kerangka Konseptual.....	11
BAB III METODE PENELITIAN	12
3.1 Waktu dan Tempat.....	12
3.2 Cara Kerja.....	12
3.2.1 Kelaikan etik.....	12
3.2.2 Pengambilan sampel.....	12
3.2.3 Pewarnaan hematoksilin-eosin (HE).....	12
3.2.4 Pembuatan kontrol negatif.....	13
3.2.5 Immunohistokimia protein Epo.....	13
3.2.6 Analisis data.....	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Analisis intensitas ekspresi Epo secara- immunohistokimia.....	15
4.2 Nilai intensitas Epo/sel pada jaringan kanker-	

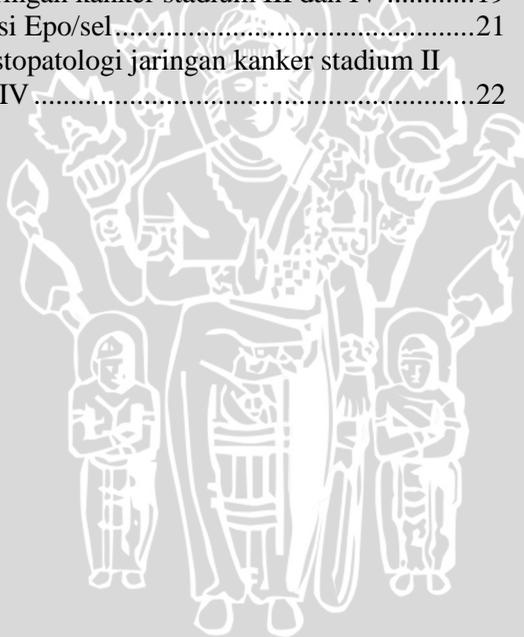
payudara.....	21
BAB V PENUTUP.....	25
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN.....	30

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	HALAMAN
2.1. Struktur gen eritropoietin.....	4
2.2. Struktur protein Epo	5
2.3. Struktur protein EpoR.....	6
2.4. Aktivasi HIF-1 pada gen-gen target	8
2.5. Persinyalan Epo dengan EpoR	9
2.6. Jalur transduksi Epo-EpoR.....	10
4.1. Hasil imunohistokimia (IHK) kontrol negatif dan kontrol positif.....	15
4.2. Histopatologi jaringan fibroadenoma mammae.....	17
4.3. Histopatologi jaringan kanker stadium I dan II.....	18
4.4. Histopatologi jaringan kanker stadium III dan IV	19
4.5. Intensitas ekspresi Epo/sel	21
4.6. Perbandingan histopatologi jaringan kanker stadium II dengan stadium IV	22



DAFTAR TABEL

TABEL	HALAMAN
Tabel L1. Medical Record Sampel Kanker Payudara	30
Tabel L2. Hasil Uji Statistik Data Penelitian	
Tabel 2a. Uji normalitas data intensitas Epo pada jaringan kanker payudara.....	31
Tabel 2b. Rata-rata intensitas Epo pada masing-masing stadium kanker.....	32
Tabel 2c. Hasil test uji homogenitas.....	33
Tabel 2d. Nilai signifikansi ekspresi Epo pada masing-masing stadium kanker	33
Tabel 2e. Nilai intensitas Epo/sel	33
Tabel 2f. Nilai signifikansi Epo/sel pada masing-masing stadium.....	34
Tabel 2g. Nilai signifikansi jumlah sel pada masing-masing stadium kanker	34



DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	HALAMAN
Lampiran 1. Medical Record Sampel Kanker Payudara.....	30
Lampiran 2. Hasil Uji Statistik Data Penelitian.....	31
Lampiran 3. Gambar Hubungan intensitas Epo dengan jumlah sel	35
Lampiran 4. Keterangan Kelaikan Etik (<i>Ethical Clearance</i>)	36



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Anova	: Analysis of Variance
bHLH	: Basic Helix-Loop-Helix
CAD	: <i>Carboxy-terminal transactivation domain</i>
CLSM	: Confocal Laser Scanning Microscope
CODDD	: Carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain
DIC	: Different Interference Contrast
Epo	: Eritropoietin
EpoR	: Eritropoietin Receptor
ER	: Estrogen Receptor
FIH	: <i>factor inhibiting HIF-1</i>
HE	: Hematoxilin-Eosin
HIF1 α	: <i>Hypoxia Inducible Factor-1</i> subunit α
IHK	: Imunohistokimia
JAK2	: <i>Janus family protein kinase 2</i>
kDa	: kilo dalton
MR	: Medical Record
NAD	: <i>Amino-terminal transactivation domain</i>
NODDD	: Amino (NH ₂)-terminal oxygen-dependent degradation domain
PBS	: Phospat Buffer Saline
PHD	: <i>prolyl hydroxylase domain</i>
PI3K	: phosphatidylinositol 3-kinase
PR	: Progesteron Receptor
pVHL	: Protein von Hippel-Lindau
STAT5	: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
WSXWS	: <i>Members of the cytokine receptor family have a consensus Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser sequence (WS motif) in the extracellular domain.</i>

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eritropoietin (Epo) adalah hormon yang berfungsi untuk meningkatkan jumlah sel eritrosit. Epo diproduksi terutama oleh ginjal dan sebagian kecil diproduksi di hati. Tetapi di bawah kondisi hipoksia semua sel pada dasarnya memiliki kemampuan untuk mentranskripsi gen Epo. Produksi Epo di ginjal bersifat terus-menerus, sedangkan produksi Epo oleh hepatosit bersifat proporsional tergantung stimulus hipoksia pada sel tersebut. Epo bersirkulasi dalam pembuluh darah dan mengikat reseptor-reseptor spesifik di sel-sel progenitor eritroid untuk memacu viabilitas, proliferasi dan diferensiasi prekursor-prekursor eritroid sehingga mengakibatkan peningkatan jumlah sel eritrosit. Peningkatan jumlah sel eritrosit menyebabkan peningkatan kapasitas oksigen darah dan meningkatkan tekanan oksigen jaringan sehingga terjadi mekanisme *feedback* negatif terhadap produksi Epo (Jelkman, 2004)

Pada kondisi hipoksia, sel kanker dapat mensintesis protein Epo dengan kontrol dari protein *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1). Protein HIF-1 merupakan faktor transkripsi yang mengatur respon adaptif terhadap kekurangan oksigen pada sel dengan mentranskripsi beberapa gen target yang berhubungan dengan pertahanan hidup sel, salah satunya adalah gen Epo. Epo bekerja melalui ikatannya dengan reseptor eritropoietin (EpoR) di eritrosit, tetapi produksi EpoR sendiri tidak dipengaruhi oleh HIF-1 α . EpoR adalah anggota dari famili reseptor sitokin. Meskipun EpoR tidak memiliki aktivitas kinase intristik, tetapi pada saat Epo berikatan dengannya akan menyebabkan teraktifkannya tirosin kinase intraseluler untuk mengaktifkan sinyal mitogenesis pada sel (Acs, dkk., 2001)

Terikatnya Epo pada EpoR di membran sel menyebabkan perubahan konformasi EpoR yang mengakibatkan transfosforilasi dan aktivasi protein JAK2 serta fosforilasi gugus residu tirosin di domain sitoplasmik EpoR oleh JAK2. Untuk mengatur ketahanan hidup sel, kompleks EpoR-JAK2 memfosforilasi molekul STAT5 sehingga bertranslokasi ke nukleus dan memicu transkripsi beberapa gen yang secara umum fungsinya adalah meningkatkan ketahanan hidup dan mencegah apoptosis sel (Weiss, 2003)

Kanker payudara merupakan kanker dengan frekuensi kejadian paling banyak pada wanita seluruh dunia dengan kejadian yang terus menerus meningkat setiap tahunnya. Terdapat lebih dari satu juta pasien baru setiap tahun dan sekitar 350.000 di antaranya terjadi di Asia (Nichols, dkk., 2005). Di Asia, *age-standardized incidence rate* (ASR) untuk kanker payudara adalah 36,2 per 100.000 populasi. Angka tersebut masih lebih rendah dibandingkan di negara-negara Barat yang mencapai lebih dari 80 per 100.000 populasi (Ferlay, dkk., 2010). Meskipun angka ASR di Indonesia masih lebih rendah di bandingkan di negara-negara Barat, tetapi karena Indonesia merupakan negara dengan jumlah penduduk terbanyak ke-4 sedunia, maka jumlah penderita kanker payudara ini telah menjadi salah satu masalah kesehatan yang serius di Indonesia.

Penelitian yang di lakukan oleh Acs, G dkk (2001) untuk mengetahui ekspresi protein Epo dan EpoR dilakukan dengan pengamatan imunohistokimia jaringan kanker payudara hasil biopsi. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa protein Epo dan EpoR berekspresi tinggi pada jaringan kanker payudara, sedangkan pada jaringan payudara normal menunjukkan ekspresi Epo dan EpoR yang rendah. Dalam penelitian tersebut diketahui juga bahwa pada jaringan kanker yang mengekspresikan kedua protein tersebut jarang ditemukan adanya mekanisme apoptosis. Dari hasil penelitian tersebut muncul dugaan kuat bahwa protein Epo dan EpoR berperan dalam proses pertahanan diri sel-sel kanker pada kondisi hipoksia. Meskipun demikian, sampai saat ini masih belum diketahui hubungan antara ekspresi protein Epo dengan tingkat progresifitas sel-sel kanker. Oleh karena itu perlu dilakukan pemeriksaan ekspresi protein tersebut beserta hubungannya dengan tingkat keparahan (stadium) kanker payudara dan peningkatan jumlah sel-sel kanker, sehingga nantinya akan diketahui apakah ekspresi protein Epo berpengaruh terhadap progresifitas penyakit kanker payudara atau tidak.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang di angkat dari penelitian ini adalah apakah terdapat perubahan ekspresi protein Epo pada jaringan kanker payudara dan bagaimanakah hubungan ekspresi protein tersebut dengan peningkatan jumlah sel-sel kanker?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi protein Epo pada jaringan kanker payudara dan mengetahui hubungan ekspresi protein tersebut dengan peningkatan jumlah sel-sel kanker.

1.4 Manfaat Penelitian

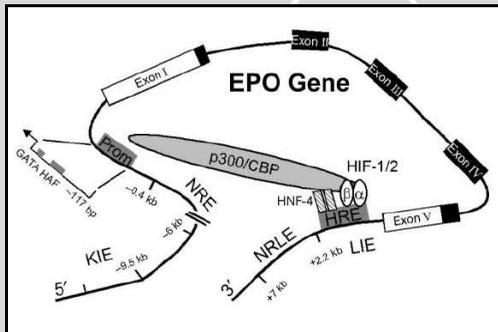
Manfaat dari penelitian ini yaitu diketahuinya fase dimana ekspresi Epo/sel paling tinggi pada jaringan kanker sehingga dapat digunakan sebagai marker deteksi dini kanker payudara.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Protein Eritropoietin (Epo)

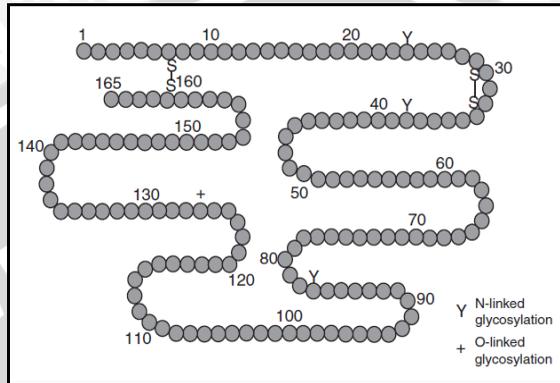
Eritropoietin adalah suatu hormon glikoprotein berukuran 30,4 kDa yang merupakan regulator utama produksi sel darah merah sebagai respons eritropoietik akibat penurunan konsentrasi oksigen pada jaringan (Jelkmann, 1992). Susunan asam amino Epo berhasil dipurifikasi tahun 1977 sedangkan gen *Epo* berhasil dikloning tahun 1985. Gen *Epo* terdiri dari daerah *promotor*, lima ekson dan *hypoxia-response element* (HRE) di daerah *enhancer* (Lin, dkk., 1985)



Gambar 2.1. Gen Eritropoietin terdiri dari daerah *promotor*, lima ekson dan *hypoxia-response element* (HRE) (Jelkmann, 1992)

Promotor gen *Epo* tidak mempunyai elemen TATA atau CAAT untuk aktivasi transkripsi. Elemen regulator transkripsi yang utama adalah *hypoxia responsive element* (HRE) yang akan berikatan dengan HIF-1 dan faktor transkripsi lain (Ebert & Bunn, 1999). Pada manusia, mRNA Epo menyandi suatu protein dengan 193 asam amino. Namun, selama modifikasi pascatranslasi terjadi pemecahan asam-asam amino di 27 N-terminal dan arginin C-terminal sehingga struktur Epo matur hanya tersusun atas 165 asam amino. Molekul Epo mengandung dua ikatan disulfida di antara asam amino 7 dan 161 serta asam amino 29 dan 33 untuk menstabilkan strukturnya. Kehilangan salah satu ikatan tersebut akan mengakibatkan hilangnya bioaktivitas Epo. Selain itu, molekul Epo memiliki tiga gugus gula terikat-N di posisi 24, 37, dan 83 serta satu gula terikat-O pada posisi

126. Gula terikat-O tidak memiliki fungsi penting, tetapi gula terikat-N penting untuk stabilitas molekul Epo di sistem sirkulasi (Farrel, 2004)



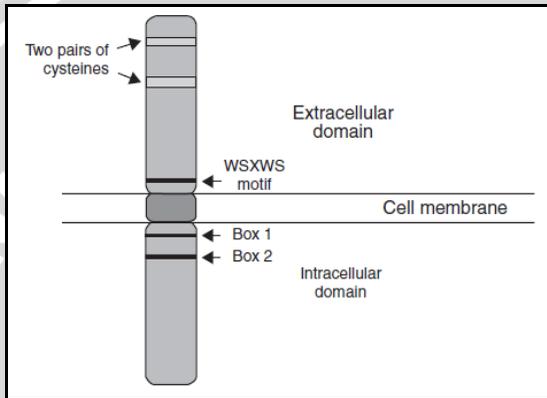
Gambar 2.2. Struktur Protein Eritropoietin dimana terdapat adanya ikatan disulfida antara asam amino 7 dengan 161 dan asam amino 29 dengan 33 (Farrel, 2004)

2.2 Struktur Protein Eritropoietin Reseptor (EpoR)

Data-data dari penelitian yang belakangan ini dilakukan menunjukkan bahwa EpoR tidak hanya terdapat pada sel noneritroid normal seperti sel endotel, sel neuron, sel leydig, myeloblast, dan megakaryosit, tetapi juga terdapat pada sel-sel tumor. Ekspresi EpoR telah di laporkan terdapat pada kanker ginjal, sel kanker payudara, kanker kulit, dan berbagai sel kanker yang lainnya. Penelitian mengenai ekspresi EpoR pada sel kanker berhubungan dengan kemampuan sel tersebut dalam mensintesis protein Epo meningkatkan dugaan bahwa penderita kanker akan mengalami peningkatan proliferasi dan pertahanan hidup dari sel kanker atau menstimulasi terjadinya angiogenesis sehingga menyebabkan pertumbuhan sel-sel tumor (Farrel, 2004).

Reseptor eritropoietin (EpoR) termasuk dalam superfamili reseptor sitokin. Reseptor dalam kelompok ini memiliki ciri-ciri tertentu, yaitu domain pengikat ligan ekstraseluler dengan dua pasang gugus sistein motif WSXWS, satu domain transmembran, dan domain intraseluler tanpa aktivitas katalitik (Brines dkk. 2004) Protein EpoR tidak memiliki aktivitas tirosin kinase intrinsik untuk mengaktifasi jalur pensinyalannya. Reseptor akan mengalami dimerisasi saat berikatan dengan protein Epo sehingga akan

mengaktivasi diferensiasi sel-sel eritroid. Domain sitoplasmik EpoR dapat dibagi menjadi dua bagian. Sekitar separuh dari domain sitoplasmik yang berada dekat membran plasma, dibutuhkan untuk membangkitkan sinyal-sinyal transduksi untuk proliferasi dan diferensiasi, sedangkan separuh lainnya dibutuhkan untuk menghentikan sinyal transduksi (Maruyama, dkk., 1994).



Gambar 2.3. Struktur Protein EpoR (Farrel, 2004)

Diketahui terdapat ekspresi EpoR yang tinggi pada jaringan kanker payudara dibandingkan pada jaringan payudara normal. Selain itu, ekspresi EpoR di endotel pembuluh darah menunjukkan potensi efek Epo pada lingkungan mikro tumor seperti stimulasi angiogenesis. Sel-sel kanker dan endotel tumor mengekspresikan EpoR yang mirip dengan EpoR fungsional pada sel-sel eritroid. Aktivasi EpoR dapat distimulasi oleh Epo dari sirkulasi sistemik (dari ginjal atau hati). Selain itu, ekspresi Epo dan EpoR di sel-sel tumor serta ekspresi EpoR di sel-sel endotel pembuluh darah dapat membangkitkan jalur aktivasi autokrin dan parakrin (Farrel, 2004)

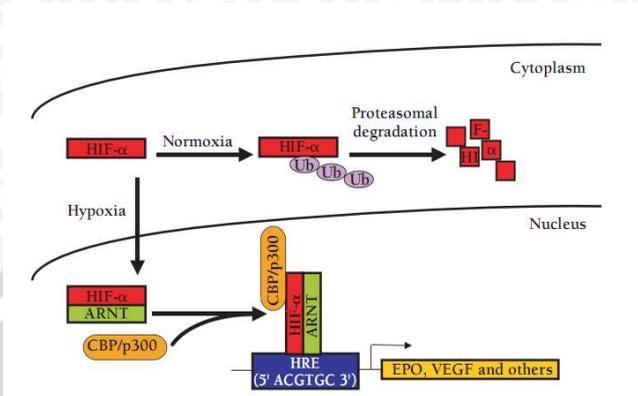
2.3 Sintesis Protein Epo oleh *Hypoksia Inducible Factor* (HIF-1)

Hipoksia yang terjadi pada sel-sel kanker akan menyebabkan sel tersebut mengekspresikan protein *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1). HIF-1 pertama kali ditemukan di 3'-flanking region yang merupakan enhancer gen eritropoietin (Epo). Gen HIF-1 berhasil diklon di awal tahun 1990-an dan diketahui bahwa protein HIF-1 tersusun dari dua subunit, yaitu HIF-1 α yang berukuran 120 kDa dan HIF-1 β yang berukuran 91-94 kDa (Wang & Semenza, 1993).

Terdapat 4 domain aktif pada molekul HIF-1 α yaitu domain bHLH untuk berikatan dengan DNA, domain PAS untuk dimerisasi, domain *amino (NH₂)-terminal oxygen-dependent degradation domain* (NODDD) dan *carboxy-terminal oxygen-dependent degradation domain* (CODDD) untuk degradasi, serta *amino-terminal transactivation domain* (NAD) dan *carboxy-terminal transactivation domain* (CAD) yang merupakan domain transaktivasi. Molekul HIF-1 β atau ARNT merupakan molekul heterodimer semua keluarga faktor transkripsi bHLH/PAS. HIF-1 β memiliki domain bHLH, PAS dan domain transaktivasi, tetapi tidak memiliki domain degradasi (NODDD/ CODDD) sehingga terekspresi secara terus menerus di semua jaringan dalam kondisi aerobik (Whitelaw, dkk., 1994).

Pengaktifan gen oleh protein HIF-1 diawali dengan terikatnya HIF-1 pada *hypoxia-responsive element* (HRE), yaitu sederetan nukleotida dengan urutan tertentu di setiap daerah *enhancer* gen-gen target HIF-1. HRE berfungsi sebagai tempat pengikatan (*binding site*) untuk HIF-1 dan aktivasi transkripsi gen-gen target HIF-1. Beberapa HRE yang paling banyak dipelajari antara lain adalah HRE pada gen eritropoietin (Epo) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Posisi HRE pada setiap gen target HIF-1 berbeda-beda. HRE untuk gen Epo berada di regio 3'UTR (*untranslated region*), sedangkan HRE gen VEGF berada di 5'*flanking region* (Semenza & Wang, 1992).

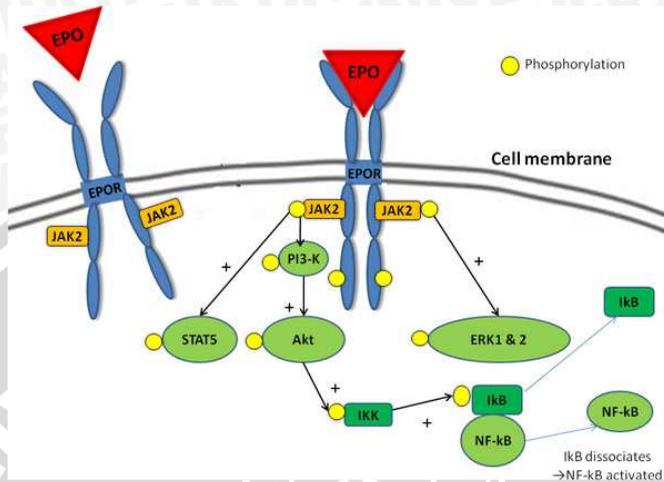
HIF-1 berperan penting dalam memicu transkripsi gen-gen target, salah satunya adalah *Epo*. Deteksi konsentrasi oksigen di dalam sel tidak dilakukan oleh HIF-1 secara langsung, tetapi hal ini dilakukan oleh dua kelompok enzim *oxygen-sensing*, yaitu protein *prolyl hydroxylase domain* (PHD) dan *factor inhibiting HIF-1* (FIH). PHD menghidroksilasi dua gugus prolin (P402 dan/atau P564) pada domain ODDD HIF-1 α . Terdapat tiga isoform PHD pada manusia, PHD2 merupakan enzim penting yang menjadikan HIF-1 α sebagai target degradasi pada kondisi normoksia (Jaakkola dkk., 2001). Jenis molekul sensor oksigen kedua adalah asparaginil hidroksilasi, yang disebut sebagai *factor inhibiting HIF-1* (FIH). Enzim ini menghidroksilasi residu asparagin (N803) di C-TAD gen HIF-1 α manusia. Modifikasi kovalen tersebut memicu interaksi C-TAD dengan koaktivator transkripsional, seperti p300 dan CBP (Lando dkk., 2002).



Gambar 2.4. Aktivasi HIF-1 pada gen-gen target (Fedele dkk., 2002)

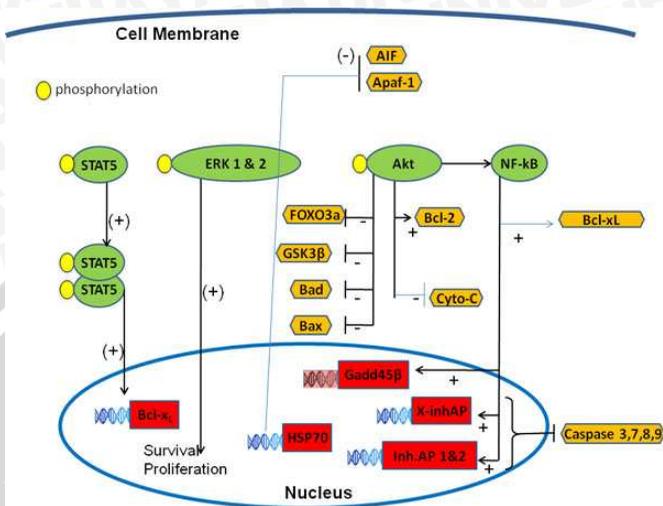
2.4 Sinyal Transduksi Epo dan EpoR

Kondisi hipoksia pada ginjal akan meningkatkan ekspresi yang di stimulasi oleh protein HIF-1. Epo di sekresikan menuju plasma dan ketika sampai di bone marrow, Epo akan berikatan dengan EpoR pada permukaan progenitor sel eritrosit. Ikatan antara Epo dengan EpoR ini menyebabkan terjadinya perubahan konformasi yang menyebabkan EpoR berasosiasi dengan molekul *Janus family protein kinase 2* (JAK2) yang menstimulasi autofosforilasi dan aktivasi JAK2. Selanjutnya, molekul JAK2 akan memfosforilasi delapan residu tirosin pada domain sitoplasmik EpoR, yang selanjutnya berfungsi sebagai *docking site* untuk berbagai protein signaling intraseluler. Salah satu protein tersebut adalah *signal transducer and activator of transcription* (STAT5) yang di fosforilasi oleh protein JAK2 sehingga berdisosiasi dari EpoR, membentuk dimer, dan kemudian bertranslokasi menuju nukleus untuk mengaktifkan berbagai target gen, salah satunya adalah inhibitor apoptosis Bcl-x (Silva dkk., 1999).



Gambar 2.5. Persinyalan eritropoietin (Epo) dan Epo reseptor (EpoR) (Moore E, 2011)

Aktivasi EpoR/JAK2 juga mengaktifkan beberapa protein intraseluler yang lainnya, termasuk Shc yang akan aktif dan mengaktifkan jalur signaling untuk proliferasi sel eritrosit, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang meningkatkan pertahanan hidup sel eritroid, serta phospholipase C- γ 1 yang berperan dalam proliferasi sel eritroid (Weiss, 2003). Aktivasi JAK2 juga mengaktifkan *heat shock protein* (Hsp) 70 yang kemudian mengikat dan meng-inaktifkan faktor-faktor proapoptotik seperti *apoptosis protease activating factor-1* (Apaf-1) dan *apoptosis-inducing factor* (AIF). Aktivasi jalur fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) menyebabkan fosforilasi protein kinase B (PKB atau AKT) yang memfosforilasi dan meng-inaktivasi regulator proapoptotik seperti Bad, caspase 9 dan GSK3 β . PKB/AKT juga memfosforilasi I κ B dan menyebabkan lepasnya *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) dan translokasinya ke nukleus di mana NF- κ B dapat memerantarai transkripsi gen-gen antiapoptotik. Selain itu, PKB/AKT juga memfosforilasi faktor transkripsi FOXO, menghambat translokasinya ke inti sel dan ligan Fas dan Bim yang pro apoptosis, dimana semua efek tersebut secara keseluruhan mengakibatkan peningkatan ketahanan hidup sel (Pajonk dkk., 2004)



Gambar 2.6. Jalur transduksi Epo-EpoR (Moore E, 2011)

2.5 Metode Immunohistokimia

Metode deteksi antigen-antibodi telah banyak dikembangkan seiring dengan penemuan teknologi mutakhir dalam bidang biologi molekuler bersamaan dengan penemuan terbaru metode produksi antibodi spesifik terhadap antigen. Kemajuan tersebut memberi kesempatan untuk membuat cara imunodiagnostik yang aman dan akurat. Kombinasi dari konsep-konsep imunologis dan histologis merupakan suatu jalan yang terbukti sangat berguna dalam biologi molekuler dan biomedis, terutama dalam analisis imunoserologis pada organ-organ dalam keadaan normal maupun patologik. Untuk tujuan tersebut telah digambarkan pendekatan kuantitatif sejak abad terakhir ini, misalnya oleh Ehrlich dan Landsteiner sebagai pelopor-pelopor dalam pengembangan teknik ini (Lehr dkk., 1999).

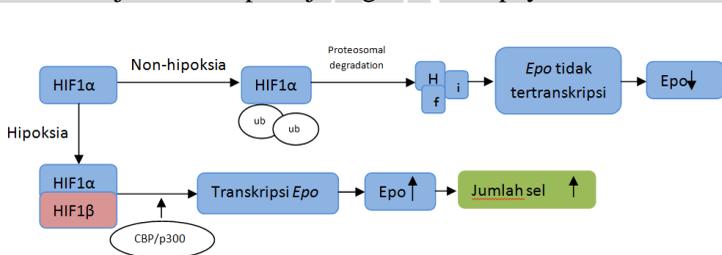
Prinsip dari teknik immunohistokimia adalah adanya ikatan antigen-antibodi yang digunakan untuk mendeteksi suatu molekul dalam jaringan. Immunohistokimia dapat mendeteksi suatu molekul yang ada di jaringan dengan menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal terhadap molekul yang akan dideteksi (menggunakan reaksi antigen-antibodi) dan dapat memberikan gambaran kualitatif dan kuantitatif dari intensitas warna yang terbentuk. Teknik immunohistokimia dapat digunakan untuk mempelajari distribusi enzim yang spesifik pada struktur sel intak (normal/lengkap),

mendeteksikan komponen sel, dan biomakromolekul seperti protein, karbohidrat (Lehr dkk., 1999).

Keunggulan metode imunohistokimia (IHK) di bandingkan dengan metode western blotting dan metode ELISA adalah bahwa pada metode IHK dapat di amati keberadaan protein pada sel secara *in situ*, yaitu melihat keberadaan protein pada tempat aslinya di dalam sel. Western blot adalah proses pemindahan protein dari gel hasil elektroforesis ke membran. Membran ini dapat diperlakukan lebih fleksibel daripada gel sehingga protein yang terblot pada membran dapat dideteksi dengan cara visual maupun fluoresensi. Deteksi ekspresi protein pada organisme dilakukan dengan prinsip imunologi menggunakan antibodi primer dan antibodi sekunder. Setelah pemberian antibodi sekunder, deteksi dilakukan secara visual dengan pemberian kromogen atau secara fluoresensi (Magi & Migliorini, 2011).

2.6 Kerangka Konseptual

Protein eritropoietin (Epo) merupakan protein yang bekerja melalui ikatannya dengan reseptor eritropoietin (EpoR). Faktor transkripsi Epo adalah protein HIF1 α yang akan aktif mentranskripsi gen Epo jika sel berada dalam kondisi hipoksia, karena pada kondisi normal (non hipoksia) protein ini akan di degradasi melalui mekanisme *proteosomal degradation*. Pada progenitor sel eritrosit, protein Epo berfungsi untuk menginduksi proliferasi dari progenitor sel-sel eritrosit tersebut, sehingga di dalam penelitian ini ingin diketahui juga apakah protein Epo mempunyai peran yang sama pada sel-sel kanker. Penambahan jumlah sel sebagai akibat jalur pensinyalan protein Epo dapat menyebabkan terjadinya perubahan histologi jaringan kanker payudara dan mungkin berakibat terhadap tingkat stadium kanker payudara. Oleh karena itu perlu di lakukan analisis ekspresi Epo dan hubungannya terhadap stadium kanker dan penambahan jumlah sel pada jaringan kanker payudara.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan mulai bulan Mei 2011 sampai November 2011 di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya Malang

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Kelaikan etik

Penelitian ini sudah mendapat sertifikat kelaikan etik (lampiran 3) dari Komisi Etik Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya (No:157A/EC/KEPK-S3-JK/06/2011) pada tanggal 23 Juni 2011.

3.2.2 Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan di ambil dari Rumah Sakit Ulin Banjarmasin dan RS. Darmais Jakarta, dari pasien yang mengalami kanker payudara mulai rentang tahun 2007 hingga 2011. Sampel pembanding juga didapatkan dari RS Darmais yang di ambil dari pasien yang mengalami fibroadenoma mammae untuk mengetahui perbedaan ekspresi Epo antara jaringan kanker payudara dengan jaringan payudara non-kanker. Sampel yang diambil berupa irisan jaringan kanker dalam blok parafin setebal $\pm 5\mu\text{m}$ yang telah ditempelkan pada slide glass.

3.2.3 Pewarnaan hematoksilin-eosin (HE)

Langkah awal dari pewarnaan HE adalah irisan jaringan kanker pada gelas preparat direndam dalam xylol I selama 10 menit dan kemudian dalam xylol II selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi dalam etanol absolut, 90% dan 70% masing masing selama 5 menit. Setelah itu slide dicuci dengan PBS selama 5 menit dan diulang sebanyak 3 kali. Kemudian preparat direndam dalam pewarna hematoksilin selama 2 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Kemudian diwarnai kembali dengan eosin selama 10 menit. Selanjutnya preparat dicuci dengan air mengalir selama 5 menit dan di dehidrasi kembali dengan etanol 70% dan

90% masing masing selama 2 menit dan dilanjutkan dengan etanol absolut selama 2 menit sebanyak 2 kali. Selanjutnya slide di rendam pada xylol I dan xylol II masing-masing selama 5 menit. Slide kemudian dikering anginkan dan ditetesi dengan enthelan, lalu ditutup dengan coverglass dan diamati (Bancroft dan Marilyn (2002) dalam Firdausi, 2008).

Selanjutnya hasil pewarnaan HE di amati dengan menggunakan mikroskop cahaya (*upright brightfield*) untuk menghitung jumlah sel pada jaringan kanker payudara. Di ambil 3 bidang pandang untuk masing-masing slide preparat untuk kemudian di hitung jumlah sel yang terdapat pada ketiga bidang pandang tersebut untuk masing-masing preparat yang di amati. Dari ketiga bidang pandang tersebut kemudian di jumlah dan hitung rata-rata jumlah sel pada masing-masing sampel. Setelah itu, dihitung rata-rata jumlah sel untuk masing-masing stadium dan kemudian di hubungkan dengan intensitas ekspresi Epo untuk dihitung intensitas ekspresi Epo/sel.

3.2.4 Pembuatan kontrol negatif

Slide preparat direndam dalam xylol I dan xylol II masing masing selama 5 menit, kemudian direndam dalam etanol absolut selama 5 menit sebanyak 2 kali dan dilanjutkan dengan etanol 90% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam PBS I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat dimasukkan dalam buffer sitrat 10mM (pH 6) dan dipanaskan dalam *microwave* pada temperatur tinggi selama 10 menit. Preparat dan wadah selanjutnya dikeluarkan dari mirowave dan ditunggu beberapa saat. Setelah itu, preparat dicuci dengan PBS I, II, III masing masing selama 5 menit, lalu di bloking menggunakan 2% susu skim selama 1 jam. Kemudian di cuci kembali dengan PBS I, II, III masing masing selama 5 menit. Kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder Rhodamin (1:1000) selama satu jam dalam suhu ruang tanpa cahaya, kemudian di cuci dengan PBS I, II, III masing-masing selama 10 menit.

3.2.5 Imunohistokimia (IHK) protein Epo

Pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan adalah pewarnaan single staining terhadap protein Epo. Sebelum di mulai proses pewarnaan, preparat terlebih dahulu di inkubasi dalam oven suhu 37°C selama \pm 24 jam, selanjutnya preparat di letakkan di atas *hot*

plate suhu 40°C selama 3 jam. Setelah itu slide preparat direndam dalam xylol I dan xylol II masing-masing selama 5 menit, kemudian direndam dalam etanol absolut selama 5 menit sebanyak 2 kali dan dilanjutkan dengan etanol 90% dan 70% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya direndam dalam PBS I, II, III masing-masing selama 5 menit. Kemudian preparat dimasukkan dalam 10mM buffer sitrat (pH 6) dan dipanaskan dalam microwave pada *high temperature* selama 10 menit. Preparat dan wadah selanjutnya dikeluarkan dari microwave dan ditunggu beberapa saat. Setelah itu, preparat dicuci dengan PBS I, II, III masing-masing selama 5 menit, lalu di *blocking* menggunakan 2% susu skim selama 1 jam. Kemudian di cuci kembali dengan PBS I, II, III masing-masing selama 10 menit. Kemudian ditetesi dengan antibodi primer EPO (1:1000) dalam 2% susu skim di suhu ruang selama 1 jam. Setelah itu, preparat dicuci lagi dengan PBS I, II, III masing-masing selama 10 menit. Preparat lalu ditetesi dengan antibodi sekunder Rhodamin (1:1000) selama satu jam dalam suhu ruang tanpa cahaya, kemudian di cuci dengan PBS I, II, III masing-masing selama 10 menit.

Hasil pewarnaan imunohistokimia di visualisasi dan diukur nilai perpendaran warnanya menggunakan CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscope*) untuk mengetahui ekspresi protein Epo pada jaringan kanker payudara. Untuk masing-masing stadium kanker digunakan 3 preparat dan tiap slide preparat yang diwarnai di ambil 3 bidang pandang sesuai dengan bidang pandang pada kontrol HE yang digunakan untuk menghitung jumlah sel. Intensitas warna dari ketiga bidang pandang tersebut selanjutnya dihitung rata-ratanya untuk masing slide, selanjutnya dihitung rata-rata intensitas ekspresi Epo pada masing-masing stadium kanker.

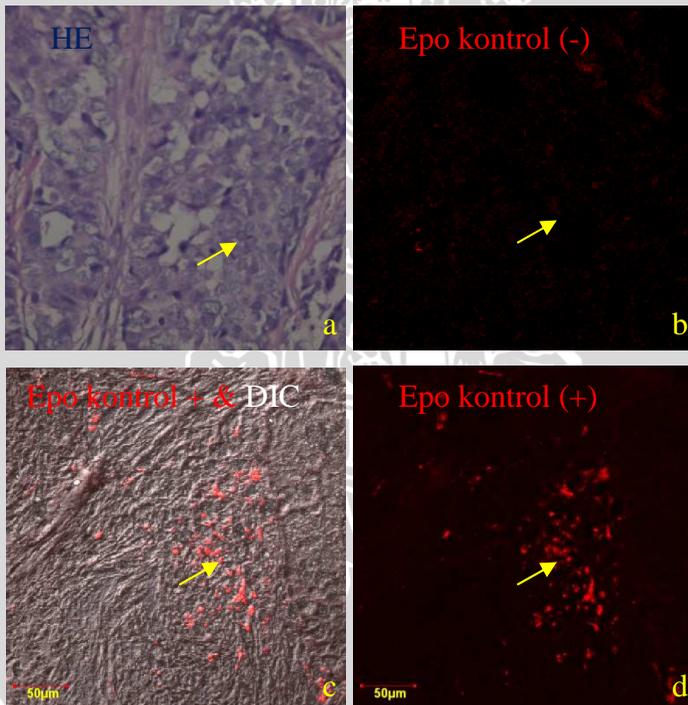
3.2.6 Analisis data

Analisis data dilakukan dengan uji *One-Way ANOVA* yang kemudian dilanjutkan dengan *Tukey test* jika nilai *P value* < 0,05 untuk mengkaji apakah terdapat perbedaan ekspresi protein Epo antara masing-masing stadium kanker (I, II, III, dan IV). Selanjutnya dilakukan penghitungan intensitas Epo/sel pada masing-masing stadium kanker dengan cara membagi nilai intensitas ekspresi Epo dengan jumlah sel pada masing-masing stadium kanker.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Intensitas Ekspresi Epo Secara Imunohistokimia

Analisis intensitas protein Epo diawali dengan pembuatan kontrol negatif dan kontrol positif pada jaringan kanker payudara untuk mengetahui tingkat keberhasilan dari proses pewarnaan imunohistokimia yang dilakukan. Kontrol negatif dan kontrol positif dibuat dari jaringan yang sama, dimana kontrol negatif dibuat tanpa melalui proses inkubasi dengan antibodi primer (anti-Epo). Hasil yang didapatkan dari pewarnaan imunohistokimia tersebut ditunjukkan pada gambar 4.1 di bawah ini:

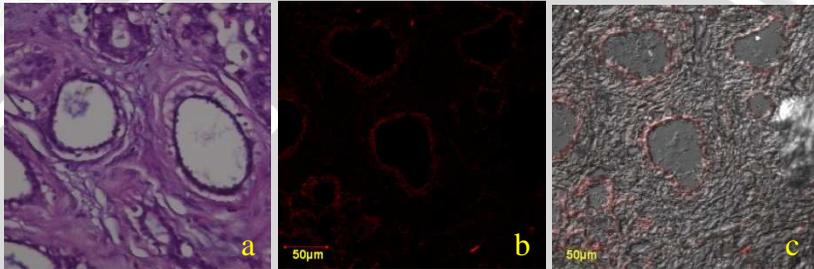


Gambar 4.1. Histopatologi jaringan kanker payudara kontrol negatif (b) kontrol positif (d), kontrol positif + DIC (c), serta kontrol HE (a), ekspresi Epo di tunjukkan dengan tanda panah (*skala IHK 50µm, perbesaran 400x*)

Hasil diatas menunjukkan bahwa proses pewarnaan imunohistokimia berhasil dikerjakan dengan cukup baik yang ditandai dengan rendahnya ekspresi Epo (pendaran warna merah) pada kontrol negatif dan tingginya ekspresi Epo pada kontrol positif. Munculnya sedikit ekspresi Epo pada kontrol negatif diduga karena proses pencucian dengan PBS setelah blocking susu skim dan inkubasi dengan antibodi sekunder kurang bersih sehingga masih ada ikatan-ikatan non spesifik. Berdasarkan analisis *trouble shooting* yang dilakukan, terdapat beberapa kemungkinan yang menyebabkan kontrol negatif dapat terwarnai, antara lain yaitu: pengenceran antibodi yang digunakan belum tepat; waktu inkubasi dengan antibodi sekunder terlalu lama; kurang bersihnya proses pencucian di antara masing-masing tahapan; enzim atau biotin pada jaringan bereaksi dengan dengan reagen, hal ini dapat dihindari dengan penambahan waktu atau konsentrasi untuk blocking; penggunaan serum untuk blocking tidak tepat. Serum untuk blocking yang digunakan harus berasal dari spesies yang sama yang digunakan untuk antibodi sekunder. Blocking dapat juga dilakukan dengan susu skim 5% atau BSA; antibodi sekunder bereaksi silang dengan protein endogen pada jaringan; media untuk embedding jaringan belum hilang secara sempurna dari jaringan; spesimen mengalami kekeringan selama dalam prosedur pewarnaan (Biologicals, 2007)

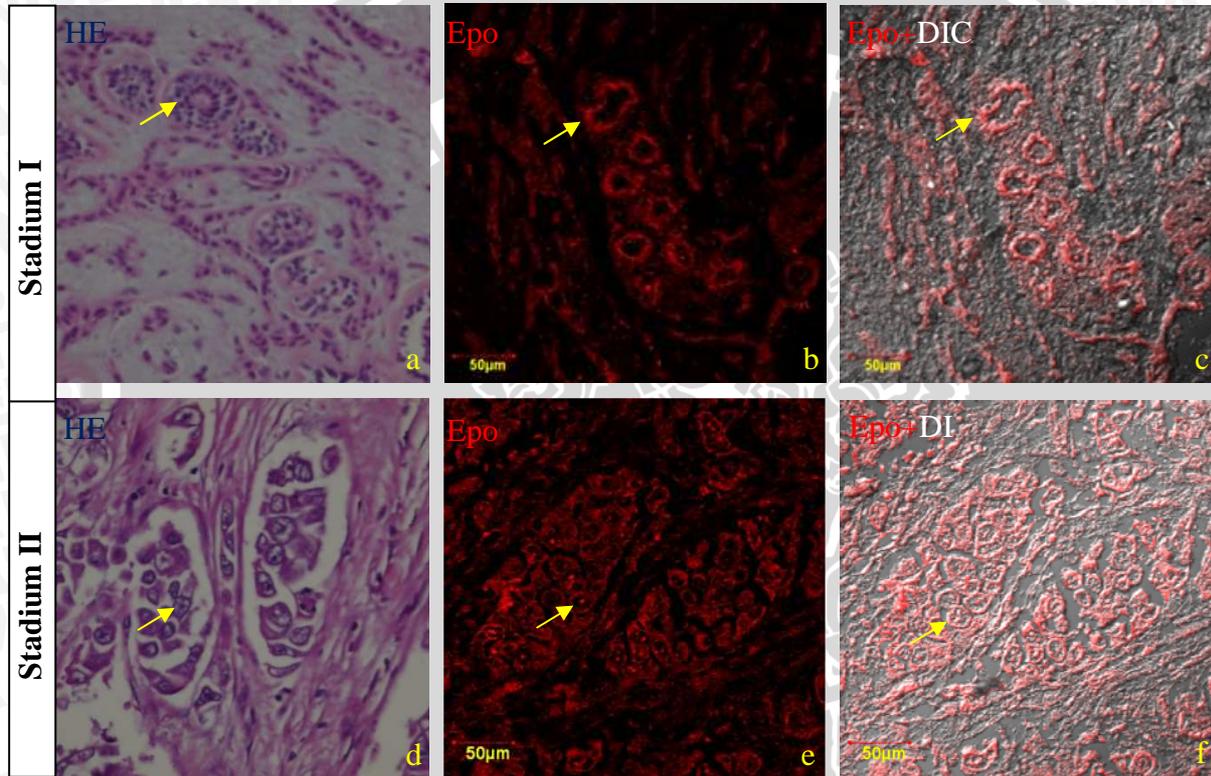
Kondisi hipoksia umumnya terjadi pada sel-sel kanker dikarenakan terjadinya disorganisasi pembuluh vaskuler disekitar sel kanker yang sedang berproliferasi. Kondisi tersebut akan memacu faktor transkripsi HIF1 α untuk mentranskripsi beberapa gen target, salah satunya adalah *Epo*. Dalam keadaan normoksia, tidak terjadi stabilisasi HIF-1 α sehingga HIF-1 α didegradasi dengan cepat dan tidak terdeteksi di sitoplasma. Prolil hidrosilase (PHD) akan menghidrosilasi gugus prolin di molekul HIF-1 α sehingga dapat berinteraksi dengan suatu kompleks ubiquitin-protein ligase melalui protein von Hippel-Lindau (pVHL). Proses penambahan gugus ubiquitin pada HIF-1 α (ubiquitinasi) menjadi tanda bagi proteasom 26S untuk mendegradasi HIF-1 α (Kizaka dkk., 2009). Di karenakan faktor transkripsi dari Epo didegradasi oleh mekanisme ubiquitinase, maka gen Epo tidak akan di transkripsi yang menyebabkan rendahnya intensitas ekspresi Epo pada jaringan yang tidak mengalami hipoksia. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan pewarnaan imunohistokimia terhadap jaringan payudara yang mengalami kelainan fibroadenoma mammae yang belum diketahui

apakah pada jaringan tersebut terjadi hipoksia atau tidak. Hal itu dilakukan untuk membandingkan intensitas ekspresi Epo antara jaringan fibroadenoma dengan jaringan kanker. Hasil dari pewarnaan jaringan fibroadenoma mammae dapat dilihat pada gambar 4.2 berikut:

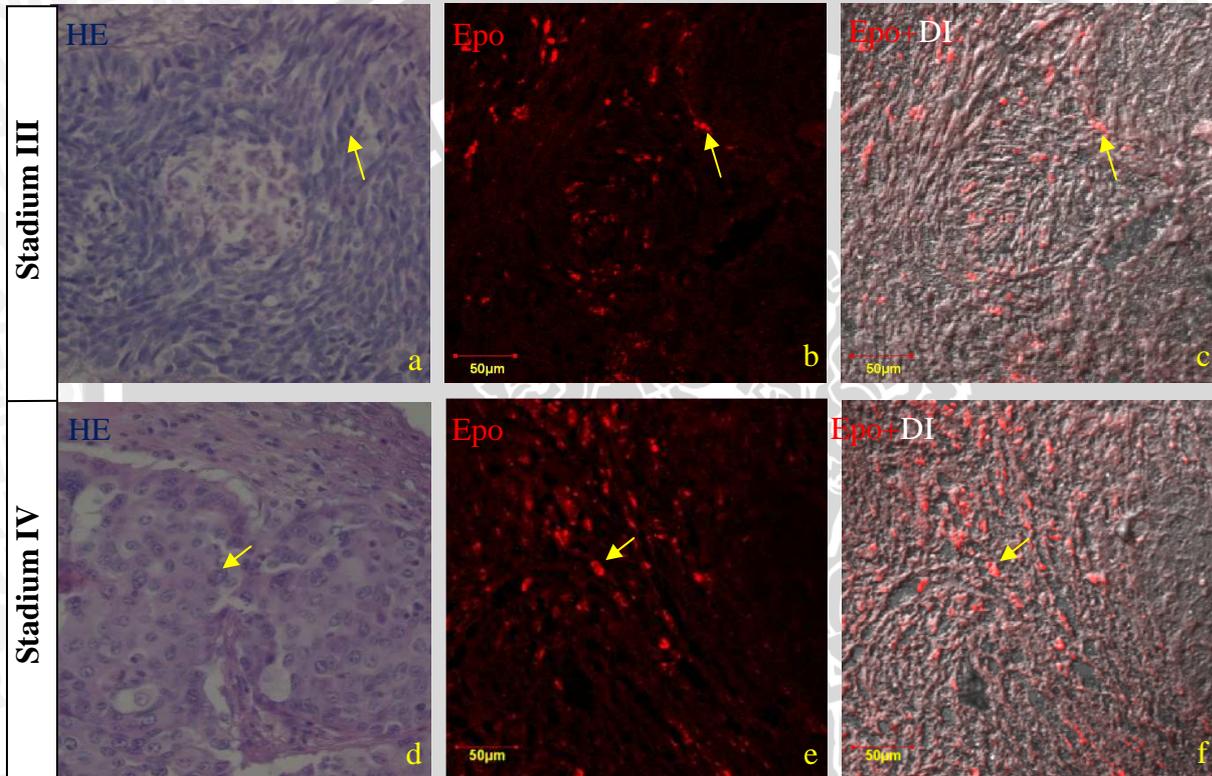


Gambar 4.2. Histopatologi jaringan fibroadenoma mammae dengan pewarnaan HE (a), dan dengan pewarnaan IHK (b,c) (Skala gambar IHK 50µm, perbesaran 400x)

Nilai intensitas ekspresi Epo dari jaringan fibroadenoma mammae di atas adalah sebesar 389 yang mana nilai tersebut selanjutnya digunakan sebagai standar baku intensitas ekspresi Epo, dimana jika nilai intensitas Epo sudah lebih dari 389 maka diduga jaringan tersebut adalah jaringan kanker. Berdasarkan dari hasil tersebut, diduga jaringan fibroadenoma mempunyai area hipoksik sehingga pada jaringan tersebut terekspresi protein Epo. Rendahnya ekspresi Epo pada jaringan tersebut menimbulkan dugaan bahwa kadar hipoksia pada jaringan fibroadenoma mammae tersebut adalah rendah. Fibroadenoma mammae adalah tumor jinak yang terjadi di payudara. Benjolan tersebut berasal dari jaringan fibrosa (mesenkim) dan jaringan glanduler (epitel) yang berada di payudara. Penyebab dari fibroadenoma mammae masih belum jelas diketahui, namun diduga bahwa faktor hormonal sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dari fibroadenoma mammae. Fibroadenoma sangat jarang atau bahkan sama sekali tidak dapat menjadi kanker atau tumor ganas (Hadramy, 2010). Setelah dibuat kontrol negatif dan pewarnaan terhadap jaringan pembanding, selanjutnya dilakukan pewarnaan terhadap jaringan kanker payudara stadium I,II,III dan IV dengan hasil sebagai berikut (gambar 4.3 dan 4.4):



Gambar 4.3. Histopatologi jaringan kanker payudara stadium I dan II. Histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan HE (a,d), histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan imunohistokimia (b,e), histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan imunohistokimia + DIC (c,f). Tanda panah menunjukkan bagian yang mengekspresikan Epo (*Skala 50µm, perbesaran 400x*)



Gambar 4.4. Histopatologi jaringan kanker payudara stadium III dan IV. Histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan HE (a,d), histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan imunohistokimia (b,e), histopatologi jaringan kanker dengan pewarnaan imunohistokimia + DIC (c,f). Tanda panah menunjukkan bagian yang mengekspresikan Epo (*Skala 50µm, perbesaran 400x*)

Hasil pewarnaan imunohistokimia jaringan kanker payudara (Gambar 4.3 dan 4.4) menunjukkan adanya ekspresi Epo baik pada sel endotel pembuluh darah maupun pada sel non endotel pembuluh darah. Endotelium merupakan membran yang melapisi bagian dalam dari sistem sirkulasi yang tersusun atas sel-sel endotel. Endotelium berfungsi untuk mengatur aliran nutrisi untuk sel, menyebarkan molekul-molekul biologi dan sebagai saluran pergerakan sel-sel darah. Peran dari sel endotel sendiri diperantarai melalui adanya reseptor membran untuk berbagai molekul seperti protein, lipid, hormon, serta senyawa-senyawa metabolit lainnya (Cines, D dkk., 1998). Berdasarkan dari fungsi sel endotel tersebut, diduga bahwa ekspresi Epo yang terdapat pada sel endotel merupakan Epo di dalam pembuluh darah yang berasal dari sel kanker itu sendiri, ginjal dan hati. Epo diproduksi terutama oleh ginjal dan sebagian kecil diproduksi di hati. Produksi Epo di ginjal bersifat terus-menerus, sedangkan produksi Epo oleh hepatosit bersifat proporsional tergantung stimulus hipoksia pada sel tersebut. Epo bersirkulasi dalam pembuluh darah dan mengikat reseptor-reseptor spesifik di sel-sel progenitor eritroid untuk memacu viabilitas, proliferasi dan diferensiasi prekursor-prekursor eritroid (Jelkman, 2004).

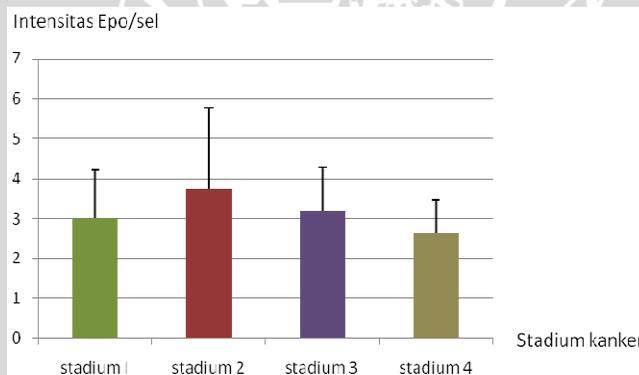
Ekspresi eritropoietin receptor (EpoR) di endotel pembuluh darah menunjukkan potensi efek Epo pada lingkungan mikro tumor. Sel-sel kanker dan endotel tumor mengekspresikan EpoR yang mirip dengan EpoR fungsional pada sel-sel eritroid. Aktivasi EpoR dapat distimulasi oleh Epo dari sirkulasi sistemik (dari ginjal atau hati). Selain itu, ekspresi Epo dan EpoR di sel-sel tumor serta ekspresi EpoR di sel-sel endotel pembuluh darah dapat membangkitkan jalur aktivasi autokrin dan parakrin (Farrel, 2004). Ekspresi Epo selain pada sel endotel juga terdapat pada sel-sel kanker (Gambar 4.4 – b,e). Hal ini di diduga karena sel-sel tersebut mengalami hipoksia, sehingga ekspresi Epo terlihat sangat jelas. Pada jaringan atau organ normal, suplai oksigen (O_2) dapat memenuhi kebutuhan sel. Namun pada tumor padat, laju konsumsi O_2 dapat melebihi suplai oksigen dan menimbulkan area-area dengan kadar O_2 yang sangat rendah (Vaupel, P dkk., 2001).

Terdapatnya ekspresi Epo pada jaringan kanker payudara semakin memperkuat dugaan bahwa Epo berperan dalam mekanisme pertahanan diri dan perkembangan sel-sel kanker, sehingga akan berpengaruh terhadap progresifitas jaringan kanker itu sendiri. Penelitian pada sel kanker berhubungan dengan kemampuan sel tersebut dalam

mensintesis protein Epo meningkatkan dugaan bahwa penderita kanker akan mengalami peningkatan proliferasi dan pertahanan hidup dari sel kanker atau menstimulasi terjadinya angiogenesis sehingga menyebabkan pertumbuhan sel-sel kanker (Farrel, 2004). Epo bekerja melalui ikatannya dengan EpoR. Aktivasi EpoR/JAK2 akan mengaktifasi beberapa protein intraseluler yang lainnya, termasuk Shc yang akan aktif dan mengkatifkan jalur signaling untuk proliferasi sel eritrosit, fosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) yang meningkatkan pertahanan hidup sel eritroid, serta phospholipase C- γ yang berperan dalam proliferasi sel eritroid (Weiss, 2003).

4.2 Nilai Ekspresi Epo/Sel Pada Jaringan Kanker Payudara

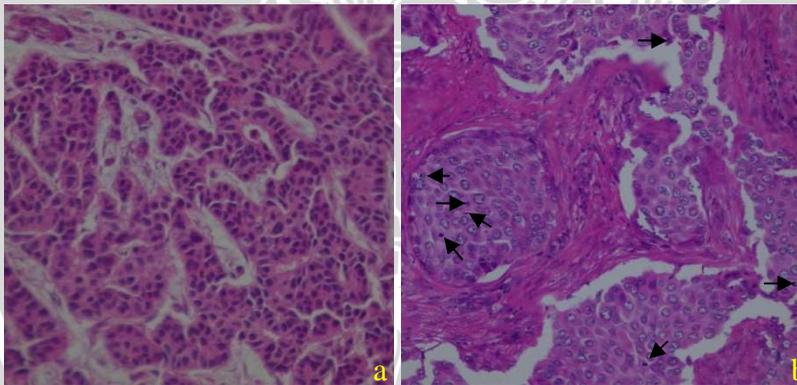
Perhitungan jumlah sel pada jaringan yang telah diwarnai dengan HE dilakukan pada 3 bidang pandang untuk masing-masing sampel. Setelah dilakukan penghitungan rata-rata jumlah sel pada masing-masing stadium kanker, selanjutnya dihitung intensitas Epo/sel untuk mengetahui kemampuan sel pada masing-masing stadium dalam mensintesis Epo. Penghitungan dilakukan dengan cara membagi rata-rata intensitas ekspresi Epo dengan jumlah sel pada masing-masing stadium. Hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada gambar 4.5 berikut:



Gambar 4.5. Nilai ekspresi Epo/sel pada masing-masing stadium kanker.

Dari hasil penelitian ini, diketahui bahwa nilai ekspresi Epo/sel paling tinggi yaitu pada sel-sel di jaringan kanker stadium II dan ekspresi Epo/sel yang paling rendah adalah pada sel-sel di jaringan kanker stadium IV. Hal ini diduga karena kemampuan sel pada

masing-masing stadium berbeda-beda dalam merespon hipoksia, dimana pada stadium II sel mempunyai kemampuan paling tinggi dalam mensintesis Epo karena stimulasi hipoksia pada jaringan. Selain itu, diduga bahwa Epo terlibat dalam mekanisme pertahanan diri sel-sel kanker di bawah kondisi hipoksia sehingga diduga tingkat hipoksia jaringan yang terjadi pada stadium II lebih tinggi daripada di stadium lain yang menyebabkan sel pada stadium II mempunyai kemampuan lebih tinggi dalam mensintesis Epo. Sedangkan kemampuan sel yang paling rendah dalam mensintesis Epo adalah pada sel-sel di jaringan kanker stadium IV. Hal tersebut dapat disebabkan karena sel kanker pada stadium IV telah banyak yang mengalami kerusakan sehingga sintesis Epo pun mengalami penurunan. Untuk mengetahui keadaan sel yang mempunyai kemampuan paling tinggi dan paling rendah dalam mensintesis Epo maka dilakukan perbandingan histopatologi jaringan kanker stadium II dengan stadium IV yang telah diwarnai HE. Berikut ini adalah perbandingan gambar histopatologi jaringan kanker payudara stadium II dan stadium IV:



Gambar 4.6 Histopatologi jaringan kanker payudara stadium II (a) dan stadium IV (b) dengan pewarnaan HE.

Berdasarkan gambar di atas, terlihat bahwa sel pada jaringan kanker stadium II terlihat tidak mengalami kerusakan, sedangkan pada stadium IV terlihat banyak sel-sel yang mengalami piknosis (ditunjukkan dengan tanda panah). Hal ini mendukung hasil pengukuran intensitas Epo/sel yang telah dilakukan, dimana pada stadium IV telah banyak sel-sel yang mengalami kerusakan sehingga kemampuan sel pada jaringan kanker stadium IV semakin menurun

dibandingkan dengan kemampuan sel pada stadium lain (Gambar 4.5). Piknosis merupakan kerusakan pada sel yang ditandai dengan terjadinya perubahan inti sel dimana batas inti menjadi tidak teratur dan inti menyusut membentuk gumpalan kecil hiperkromatik yang berwarna lebih gelap (Gunawan, 2008)

Hasil dari penelitian ini memperlihatkan bahwa rata-rata jumlah sel antar stadium kanker tidak berbeda nyata (Lampiran 3), sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Acs., dkk (2001) dengan menggunakan berbagai kultur sel kanker payudara yang ditreatmen dengan rhEPO (recombinant human eritropoietin) menunjukkan bahwa prosentase jumlah sel yang di treatmen dengan menggunakan rhEPO lebih banyak dibandingkan prosentase jumlah sel kontrol (tanpa rhEPO). Pada penelitian Acs., dkk tersebut, sel-sel pada perlakuan kontrol sama sekali tidak di treatmen dengan rhEPO sehingga ketika dibandingkan dengan sel yang telah di treatmen dengan rhEPO akan menghasilkan perbedaan jumlah sel yang signifikan. Akan tetapi pada penelitian ini, penghitungan sel dilakukan pada jaringan kanker stadium I,II,III dan IV dimana pada masing-masing jaringan tersebut diketahui mengekspresikan Epo meskipun nilai ekspresinya berbeda-beda, sehingga diduga bahwa Epo berperan dalam mekanisme proliferasi sel dan pertahanan diri sel kanker akan tetapi nilai ekspresi Epo tidak berpengaruh terhadap tingkat dari proliferasi sel-sel tersebut. Diduga terjadi proses homeostatis antara Epo dengan reseptornya sehingga ketika jumlah Epo dalam jaringan tinggi maka jumlah reseptornya akan menurun dan begitu juga sebaliknya. Hal tersebut menyebabkan jumlah Epo yang diterima oleh sel akan sesuai dengan yang dibutuhkan oleh sel tersebut. Pada beberapa sel, jumlah reseptor dapat berubah dari waktu ke waktu. Jika hormon disekresi terlampaui tinggi daripada kebutuhan normalnya, maka target sel akan mengalami *down regulation* (penurunan jumlah reseptor) sebagai respon untuk menyeimbangkan jumlah hormon yang akan diterima oleh sel (Silverthorn, 2004).

Ekspresi Epo pada uterus dan oviduk selain diatur oleh hipoksia juga diatur oleh hormon estrogen (Yasuda Y, dkk., 1998). Dari penelitian ini diketahui bahwa 80% dari sampel yang digunakan mengekspresikan estrogen reseptor dan 90% mengekspresikan progesteron reseptor. Data mengenai estrogen reseptor dan progesteron reseptor tersebut diambil dari *Medical Record* (RS. Darmas Jakarta) sampel yang digunakan dalam

penelitian ini. Ekspresi ER dan PR pada Medical Record diketahui dari hasil pewarnaan imunohistokimia ER dan PR, dimana dari MR tersebut hanya diketahui apakah suatu jaringan mengekspresikan ER/PR maupun tidak, dan tidak diketahui berapa nilai ekspresi dari ER/PR tersebut. Akan tetapi, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Acs, G., dkk (2004) menunjukkan bahwa nilai ekspresi ER dan PR terhadap nilai ekspresi Epo pada sampel jaringan tumor endometrium adalah berbanding terbalik, dimana ekspresi ER dan PR lebih tinggi ketika ekspresi Epo rendah. Akan tetapi pada jaringan kanker endometrium diketahui bahwa ekspresi ER dan PR tidak berpengaruh signifikan terhadap ekspresi Epo. Ekspresi ER dan PR tetap sama meskipun ekspresi Epo berubah-ubah. Berdasarkan hasil tersebut, diduga bahwa ekspresi Epo pada jaringan endometrium normal diatur oleh hormon estrogen dan progesteron. Hipotesis ini juga didukung dengan penemuan bahwa pada 5'-flanking region dari gen EPO pada manusia terdapat sekuens yang homolog dengan sekuens yang responsibel untuk pengikatan ER (Yasuda Y, dkk., 1998). Akan tetapi, terdapat mekanisme yang berbeda untuk jaringan yang mengalami kanker endometrium. Tidak ditemukan adanya korelasi antara ekspresi Epo terhadap ekspresi ER maupun PR, sehingga diduga bahwa pada kanker endometrium ekspresi Epo tidak dipengaruhi oleh hormon steroid. Tingginya ekspresi Epo pada sel kanker endometrium diduga berhubungan dengan hipoksia tumor yang diatur oleh protein HIF1 α (Acs, G dkk., 2004).



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel pada jaringan kanker stadium II memiliki kemampuan paling tinggi dalam mensintesis protein Epo dan kemampuan sel dalam mensintesis Epo semakin menurun pada stadium III dan IV. Berdasarkan hasil perhitungan jumlah sel diketahui bahwa nilai intensitas ekspresi Epo tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah sel pada jaringan kanker payudara.

5.2 Saran

Untuk penelitian lebih dalam mengenai aktivitas Epo pada jaringan kanker payudara, akan lebih baik lagi jika untuk masing-masing jenis sel dibedakan saat penghitungannya, sehingga akan diketahui lebih spesifik pada sel apa Epo berekspresi paling tinggi. Selain itu, jika ingin dilakukan penelitian ekspresi Epo pada lingkungan *in vivo*, maka sebaiknya diukur juga protein-protein lain yang terkait dengan protein Epo seperti EpoR dan HIF1 α .

DAFTAR PUSTAKA

- Acs, G, P Acs, Susan M Beckwith, Richard L Pitts, Emily Clements, Kondi Wong, dan Ajay Verma. 2001. Advances in Brief Erythropoietin and Erythropoietin Receptor Expression in Human Cancer 1. *Health (San Francisco)*: 3561-3565.
- Acs G, Acs P, Beckwith SM. 2001. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* (61):3561-3565.
- Biologicals, Novus. 2011. Troubleshooting Immunohistochemical staining. <http://www.novusbio.com>, tanggal akses: 02 Januari 2012.
- Brines, Michael, Giovanni Grasso, Fabio Fiordaliso, Alessandra Sfacteria, Pietro Ghezzi, Maddalena Fratelli, Roberto Latini, dkk. 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and commonⁿ subunit heteroreceptor. *October* 101, no. 41.
- Ebert, B L, dan H F Bunn. 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94, no. 6 (September 15): 1864-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477715>.
- Fairchild Benyo D, Conrad KP. 1999. Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol Reprod* (60):861-870
- Farrel, Francis. 2004. Oncologist in Tumor Cells and Other Tissues. *Growth Factors* 9, no. suppl 5: 18-30.
- Ferlay, J, H R Shin, F Bray, D Forman, C Mathers, and D M Parkin. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* (June 17). doi:10.1002/ijc.25516. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560135>.
- Gunawan, S A. 2008. Pengaruh Akut Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Akar Senggugu (*Clerodendron Serratum* Spreng) Terhadap Gambaran Histopatologis Hepar Mencit Balb/C. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Hadramy, S. 2010. Fibroadenoma Mammae. <http://www.nhs.uk>, tanggal akses: 28 Desember 2011.
- Jaakkola, Panu, David R Mole, Ya-min Tian, Michael I Wilson, Janine Gielbert, Simon J Gaskell, Alexander Von Kriegsheim,

- et al. 2001. Targeting of HIF-1 to the von Hippel – Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science* 292, no. April: 468-472.
- Jelkmann, W. 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological reviews* 72, no. 2 (April): 449-89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1557429>.
- Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, Hiraoka M. 2009. The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliver Rev* (61):623-32.
- Lando, David, Daniel J Peet, Jeffrey J Gorman, Dean A Whelan, Murray L Whitelaw, dan Richard K Bruick. 2002. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & Development*: 1466-1471. doi:10.1101/gad.991402.
- Lehr, H, C. M. van der Loss, P. Teeling, dan M. Gown. 1999. Complete Chromogen Separation and Analysis in Double Immunohistochemical Stains Using Photoshop-based Image Analysis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 47, no. 1 (January 1): 119-125. doi:10.1177/002215549904700113. <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/002215549904700113>.
- Lin, FK, S Suggs, CH Lin, J K Browne, R Smalling, J C Egie, K K Chen, G M Fox, F Martin, dan Z Stabinsky. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, no. 22 (November): 7580-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590305>.
- Magi, Barbara, dan Lucia Migliorini. 2011. Western blotting for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. *The new microbiologica* 34, no. 1 (January): 93-5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669550>.
- Maruyama, K, K Miyata, dan Yoshimura. 1994. Proliferation and erythroid differentiation through the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor. *The Journal of biological chemistry* 269, no. 8 (February 25): 5976-80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119943>.
- Nichols, Hazel B, Amy Trentham-dietz, Richard R Love, John M Hampton, Pham Thi, Hoang Anh, D Craig Allred, Syed K

- Mohsin, dan Polly A Newcomb. 2005. Differences in Breast Cancer Risk Factors by Tumor Marker Subtypes among Premenopausal Vietnamese and Chinese Women Differences in Breast Cancer Risk Factors by Tumor Marker Subtypes among Premenopausal Vietnamese and Chinese Women. *Cancer Research*: 41-47.
- Ohigashi T, Yoshioka K, Fisher JW. 1996. Autocrine regulation of erythropoietin gene expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci* (58):421-427
- Pajonk, Frank, Antonia Weil, Alfred Sommer, Rafal Suwinski, dan Michael Henke. 2004. The erythropoietin-receptor pathway modulates survival of cancer cells. *Oncogene*: 8987-8991. doi:10.1038/sj.onc.1208140.
- Semenza, G L, dan G L Wang. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 12, no. 12 (December): 5447-54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=360482&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Silva, Maite, Adalberto Benito, Cristina Sanz, Felipe Prosper, Daryoush Ekhterae, dan Jose Luis Fernandez-luna. 1999. Erythropoietin Can Induce the Expression of Bcl-x L through Stat5 in Erythropoietin-dependent Progenitor Cell Lines *. *Biochemistry* 274, no. 32: 22165-22169.
- Silverthorn, D. U. 2004. Human physiology: an integrated approach. Prentice Hall Inc, New Jersey.
- Smith, Mike, Bernie Dardzinski, Anthony O Fedele, Murray L Whitelaw, dan Daniel J Peet. Department of Molecular Biosciences (Biochemistry) and the Centre for the Molecular Genetics of Development, University of Adelaide, Adelaide, South Australia 5005, Australia. *Review Literature And Arts Of The Americas* 2, no. 4: 229-243.
- Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. 2001. Treatment resistance of solid tumors. Role of hypoxia and anemia. *Med Oncol*, (18):243-59.
- Wang, G L, dan G L Semenza. 1993. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 9 (May 1): 4304-8.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=46495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Weiss, Mitchell J. 2003. Oncologist New Insights Into Erythropoietin and Epoetin Alfa : *Signal Transduction* 8, no. suppl 3: 18-29.
- Westenfelder C, Baranowski RL. 2000. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney Int* (58):647-657.
- Whitelaw, Murray L, Janake Gustafsson, dan Lorenz Poellinger. 1994. Identification of Transactivation and Repression Functions of the Dioxin Receptor and Its Basic Helix-Loop-Helix / PAS Partner Factor Arnt : Inducible versus Constitutive Modes of Regulation 14, no. 12: 8343-8355.
- Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. 1998. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J BiolChem*, (273):25381-25387.



Lampiran 1. Medical Record Sampel Kanker Payudara dari RS Darmais Jakarta

No	Nama	No. PA	Hb	Leu	Erit	Hemat	Trombo	TNM	Stadium	Imunohistokimia		
										ER	PR	HER2
1	Elly Firza	H10-1185	12,6	6,8	4,45	38,6	282	T1N0M0	1	+	+	1
2	Fan Lian Tjong	H10-0927	12,3	36,6	4,21	37,2	202	T1N0M0	1	+	+	-
3	Prasdiana Baharia	H10-0433	12,2	8,27	4,39	39,5	289	T1N0M0	1	+	+	-
4	Hamidah	H/I 10601	11,4	7,6	4,95	34,4	276		2			
5	Cecilia Darmadi	H10-0428	14,9	7,7	5	45,9	322	T2N0M0	2	+	+	-
6	Jumlah	H10-1759	13,8	5,48	4,72	42,9	281	T2N0M0	2	+	+	-
7	Diyem	PA/I11106	11,2	5,8	4,22	32	322	T2N1M0	3b			
8	Rita Indriani	H10-1800	11,7	8,51	6,14	38,9	340	T3N1M0	3	+	+	-
9	Rosliyati	H10-2268	13,1	19,5	5,46	41,4	775	T4N0M0	3b	-	+	-
10	Hanny Johan	H10-0990	10,6	9,58	4,06	34,2	363	T4N1M1	4	+	+	2
11	Naimie Eva	H10-0009	12	8,25	4,46	36,5	288		4	+	+	-
12	Ika Andriana	H10-0042	10,6	8,01	3,75	34	229	T4N2M1	4	-	-	3

Lampiran 2. Hasil Uji Statistik Data Penelitian

Tabel 2a. Uji normalitas data intensitas Epo pada jaringan kanker payudara

Descriptive Statistics					
	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
intensitas ekspresi	12	1.6210E3	389.84692	965.50	2219.63
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test					
					intensitas ekspresi
N					12
Normal Parameters ^a	Mean				1621.0383
	Std. Deviation				389.84692
Most Extreme Differences	Absolute				.131
	Positive				.120
	Negative				-.131
Kolmogorov-Smirnov Z					.455
Asymp. Sig. (2-tailed)					.986
a. Test distribution is Normal.					

Tabel 2b. Tabel rata-rata intensitas Epo pada masing-masing stadium kanker

intensitas
ekspresi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
stadium I	3	1.1781E3	224.79467	1.29785E2	619.7124	1736.5543	965.50	1413.38
stadium 2	3	1.4029E3	118.04701	68.15448	1109.6983	1696.1884	1321.68	1538.35
stadium 3	3	1.8160E3	98.57930	56.91478	1571.1554	2060.9246	1707.04	1898.95
stadium 4	3	2.0870E3	115.50863	66.68894	1800.0973	2373.9760	2008.23	2219.63
Total	12	1.6210E3	389.84692	1.12539E2	1373.3414	1868.7352	965.50	2219.63

Tabel 2c. Hasil test uji homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.893	3	8	.485

Tabel 2d. Nilai signifikansi ekspresi Epo pada masing-masing stadium kanker

Tukey HSD

stadium	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
stadium I	3	1.1781E3	
stadium 2	3	1.4029E3	
stadium 3	3		1.8160E3
stadium 4	3		2.0870E3
Sig.		.315	.191

Tabel 2e. Nilai intensitas Epo/sel

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
stadium I	3	3.0070	1.21184	.69966	1.73	4.14
stadium 2	3	3.7533	2.02013	1.16632	1.72	5.76
stadium 3	3	3.1800	1.09823	.63406	2.37	4.43
stadium 4	3	2.6367	.84642	.48868	1.82	3.51
Total	12	3.1442	1.23915	.35771	1.72	5.76

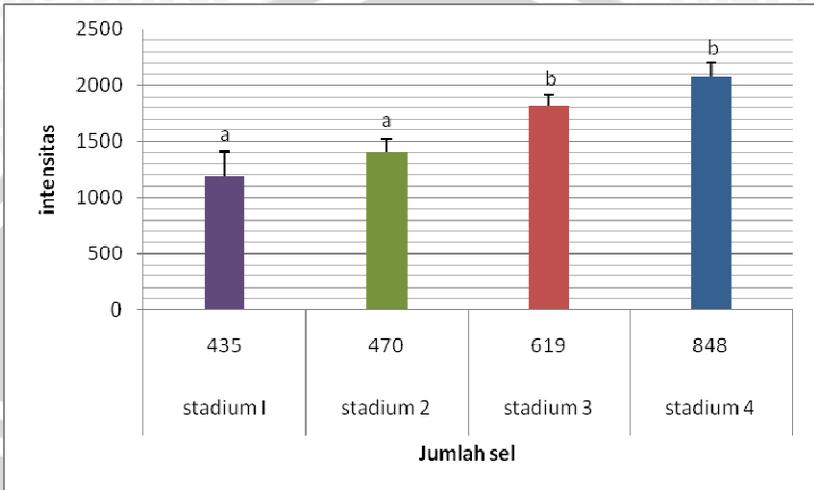
Tabel 2f. Nilai signifikansi Epo/sel pada masing-masing stadium

Tukey HSD		
stadium	N	Subset for alpha = 0.05
		1
stadium 4	3	2.6367
stadium I	3	3.0070
stadium 3	3	3.1800
stadium 2	3	3.7533
Sig.		.753

Tabel 2g. Nilai signifikansi jumlah sel pada masing-masing stadium kanker

Tukey HSD		
stadium	N	Subset for alpha = 0.05
		1
stadium I	3	428.67
stadium 2	3	470.33
stadium 3	3	619.33
stadium 4	3	848.33
Sig.		.189

Lampiran 3. Gambar Hubungan Intensitas Ekspresi Epo terhadap Jumlah Sel pada masing-masing stadium



Lampiran 4. Keterangan Kelaikan Etik (*Ethical Clearance*)



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MEDICAL FACULTY BRAWIJAYA UNIVERSITY
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
THE ETHICAL COMMITTEE MEDICAL RESEARCH

Jalan Veteran Malang – 65145

Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 157A / EC / KEPK- S3- JK / 06 / 2011

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Jalur Pensinyalan *Hypoxia-Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α) Eritropoietin Intraseluler dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) Pada Penderita Kanker Anemik : Kanker Payudara Sebagai Model

PENELITI UTAMA : dr. Muhammad Darwin Prenggono, SpPD KHOM

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

DINYATAKAN LAIK ETIK



Malang, 23 JUN 2011

Prof. Dr. dr. Moch. Istiadjid ES, SpS, SpBS, M.Hum

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

