

616.934

Yud e al.

**CATCHING RHU-MAB HER2 DALAM KALSIUM ALGINAT
SEBAGAI UPAYA PEMBUATAN PROTOTIPE**

IMUNOSENSOR PENDETEKSI HER2

*(CATCHING RHU-MAB HER2 IN CALSIUM ALGINATE FOR CREATING
IMMUNOSENSOR PROTOTYPE FOR HER2 DETECTION)*

Penelitian Eksperimental Laboratoris



TESIS

**Untuk memenuhi persyaratan mencapai
derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

EKA YUDHANTO

NIM : G4A. 002 050

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO**

SEMARANG

2005

LEMBAR PENGESAHAN

TESIS

**CATCHING RHU-MAB HER2 DALAM KALSIUM ALGINAT
SEBAGAI UPAYA PEMBUATAN PROTOTIPE IMUNOSENSOR
PENDETEKSI HER2**

*(CATCHING RHU-MAB HER2 IN CALSIUM ALGINATE FOR CREATING IMMUNOSENSOR
PROTOTYPE FOR HER2 DETECTION)*

Penelitian Eksperimental Laboratoris

disusun oleh :

EKA YUDHANTO

NIM : G4A. 002 050

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji pada tanggal 29 September 2004

dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

Pembimbing Ketiga



Dr. H. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk Dr. Edi Dharmana, MSc, PhD DR. Ing. H. Suparno Satira, DEA

NIP : 130 675 341

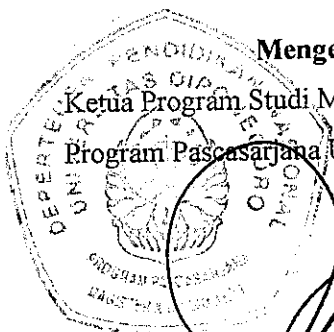
NIP : 130 529 451

NIP : 130 515 678

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Program Pascasarjana Universitas Diponegoro



Prof. Dr. H. Soebowo, SpPA (K)

NIP : 130 352 549

UPT-PUSTAK-UNDIP

No. Daft: 3577/T/MB/eq...

Tgl. : 4/3 04

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil buah pikiran dan pekerjaan saya sendiri yang di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, September 2004

Penulis

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas karunia, rahmat, dan hidayahNya sehingga kami telah menyelesaikan tugas penulisan tesis dalam memenuhi persyaratan untuk menyelesaikan Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana di Universitas Diponegoro.

Kami menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna, hal ini semata-mata karena ketidakmampuan kami. Namun berkat dorongan dari keluarga, teman-teman, dan bimbingan dari guru-guru kami, maka tulisan ini dapat terwujud.

Oleh karena itu, pada kesempatan ini perkenankanlah kami menghaturkan rasa hormat dan terima kasih yang tulus kepada :

1. Direktur Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, yang membuka peluang kepada siapa saja yang memenuhi syarat untuk meningkatkan ilmu pengetahuan.
2. Prof. Dr. H. Soebowo, SpPA (K), selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro yang telah memberikan dorongan dan motivasi untuk dapat menyelesaikan studi program S2 biomedik.
3. Dr. H. Abdul Wahab, SpB, SpBO, FICS, selaku Ketua Bagian Ilmu Bedah FK Undip / Kepala SMF Bedah Perjan RSUP Dr. Kariadi Semarang yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan pengarahan dan dorongan moril selama pendidikan.
4. Dr. H. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk, selaku pembimbing utama dan Ketua Program Studi Ilmu Bedah FK Undip yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing, memberi dukungan, referensi, arahan, dan dorongan moril dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
5. Dr. Edi Dharmana, MSc, PhD, selaku pembimbing kedua dan dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing, memberi dukungan, referensi, arahan, dan dorongan moril dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.
6. DR. Ing. H. Suparno Satira, DEA, dari Institut Teknologi Bandung selaku pembimbing ketiga yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam memberi, membimbing, dan membuka wawasan baru dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.

7. Prof. DR. Dr. Tjahjono, SpPA (K), FIAC, selaku Pengelola Program Studi Magister Ilmu Biomedik Kelas Khusus PPDS Program Pascasarjana Undip yang telah memberikan dorongan dan motivasi untuk dapat menyelesaikan studi S2.
8. Prof. DR. Dr. Ign. Riwanto, SpB-KBD, Dr. Pudjadi, SU, DR. Dr. Hertanto W. Subagio, MS, serta seluruh dosen Program Studi Magister Ilmu Biomedik selaku pembimbing dan nara sumber yang senantiasa memberikan pengarahan, referensi, dan dukungan selama mengikuti pendidikan magister, penelitian dan penyusunan tesis ini.
9. Prof. DR. Dr. H. A. Faik Heyder, SpB, SpBTV, selaku pembimbing metodologi penelitian Program Magister Ilmu Biomedik PPDS I Ilmu Bedah FK Undip yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing, memberi dukungan, dan arahan penelitian dan penyusunan tesis ini.
10. Guru-guru kami di Bagian Ilmu Bedah FK Undip Semarang yang sangat kami hormati : Dr. F. Sutoko, SpB, SpBP; Dr. R. Saleh Mangunsudirdjo SpB, SpBO, FICS (Alm); Dr. Darsito, SpB-KBD; DR. Dr. Rudi Yuwana, SpB, SpU; DR. Dr. H. Rifki Muslim, SpB, SpU; Dr. H. Abdul Wahab, SpB, SpBO, FICS; Dr. Andy Maleachi, SpB-KBD, Dr. Karsono Mertowidjojo, SpB, SpBP; Prof. DR. Dr. Ign. Riwanto, SpB-KBD, Prof. DR. Dr. H. A. Faik Heyder, SpB, SpBTV; Dr. H. Djoko Handojo, SpB, SpBOnk; Dr. H. Yulianto Suwardi SpB, SpBA; Dr. Sidharta Darsojono, SpB, SpU; Dr. H. Subianto, SpB, SpBOnk; Dr. H. Johnny Sjoeb, SpB-KBD; Dr. Bambang Sutedjo, SpB, SpBO, FICS; Dr. Ardy Santosa, SpU; Dr. Artisto Putro, SpB, SpBOnk (alm); Dr. M. Mulyono, SpB-KBD; Dr. Sahal Fatah, SpB, SpBTV; Dr. Benny Issakh, SpB, SpBOnk; Dr. Djeni Bijantoro, SpB, SpBA; Dr. M. Adi Soedarso, SpU; Dr. Gunadi, SpBS; Dr. Zainal Muttaqien, PhD, SpBS; Dr. Erie BPS Andar, SpBS; atas segala curahan ilmu dan bimbingan selama masa PPDS I Ilmu Bedah.
11. Ayahanda Dr. Tjenol Poeger, SpPD dan Ibunda Drg. Mustamirah; orang tua tercinta yang dengan penuh pengorbanan dan kasih sayang yang tak terhingga telah mengasuh, membesarkan, mendidik, memotivasi, dan menanamkan rasa disiplin dan tanggung jawab; sujud dan bakti kami haturkan.
12. Ayahanda DR. H. Muhtarom HM dan Ibunda Hj. Sri Murni; mertua yang penuh perhatian tak henti-hentinya memberikan dorongan semangat, dukungan, motivasi, dan doa; sujud dan bakti kami haturkan.

13. Isteriku tercinta Dr. Zinatul Faizah, SpA, putra-putraku tercinta Irsyad Azharusyarif Yudhiza Putra dan Fakhry Ardhusyarif Yudhiza Putra; yang mendampingi dengan tabah, sabar, dan setia; serta memberikan dorongan, inspirasi, dan kesejukan hati selama kami menjalani pendidikan.
14. Tauhid Nur Azhar, PhD; sahabat kami yang telah banyak memberikan waktu, tenaga, dan wawasan keilmuan yang luas bagi penelitian ini.
15. Dra. Annisa Aprilia; sahabat kami yang dengan keuletan dan kerajinannya telah banyak berjasa membantu berjalannya proses penelitian ini.
16. Ibu Lusia Kandani serta pimpinan PT Roche Indonesia, yang dengan kemurahan hatinya menyediakan bahan antibodi bagi penelitian ini demi pengembangan ilmu pengetahuan.
17. Bapak Triyanta, PhD, beserta staf Departemen Fisika ITB yang telah memberikan akses dan kemudahan bagi penggunaan fasilitas laboratorium di lingkungannya.
18. Bapak Wikanda, serta staf Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi, yang telah berbaik hati menyediakan fasilitas SEM untuk pemeriksaan hasil percobaan.
19. Rekan-rekan residen PPDS I Ilmu Bedah FK Undip dan para mahasiswa Program Magister Ilmu Biomedik atas bantuan dan kerja sama dalam suka dan duka selama menempuh pendidikan.
20. Kepada semua pihak yang tidak mungkin kami sebutkan satu-persatu namun turut berperan terhadap pelaksanaan penelitian dan penyusunan tesis ini, kami ucapkan terima kasih sebesar-besarnya.

Semoga Allah SWT selalu berkenan memberikan rahmat dan hidayahNya kepada kita semua.
Amin.

Semarang, Januari 2005

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan	4
1.4. Manfaat	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Onkogen HER2	5
2.2. Antibodi	10
2.2.1. Interaksi Antibodi-Antigen	11
2.2.2. Antibodi HER2	14
2.3. Metode Analisis Laboratorium HER2	16
2.3.1. Imunohistokimia (<i>Immunohistochemistry/IHC</i>)	16
2.3.2. Teknik Amplifikasi Gen	18
2.3.3. <i>Enzyme Immunoassays (EIA)</i>	18
2.3.4. <i>Laser Capture Microdissection (LCM)</i>	19
2.4. Biosensor	20
2.5. Imunosensor	22
2.5.1. Imunosensor Elektrokimia / Elektrobiokimia	24
2.5.2. Imunosensor Akustik Piezoelektrik	25
2.5.3. Imunosensor Termometrik	25
2.5.4. imunosensor Reflektometrik dan Elipsometrik	26
3 KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	29
3.1. Kerangka Teori	29

	3.2. Kerangka Konsep	30
4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	31
	4.1. Desain Penelitian	31
	4.2. Tempat Penelitian	31
	4.3. Waktu Penelitian	31
	4.4. Batasan Sampel Penelitian	32
	4.4.1. Bahan	32
	4.4.2. Pengambilan Sampel	32
	4.4.3. Besar Sampel	32
	4.5. Identifikasi Variabel	33
	4.5.1. Variabel Bebas	33
	4.5.2. Variabel Tergantung	33
	4.5.3. Kebutuhan Alat dan Bahan	34
	4.6. Pelaksanaan Proses <i>Catching</i> Antibodi	35
5	HASIL PERCOBAAN	39
	5.1. Hasil Foto <i>Scanning Electron Microscope (SEM)</i>	40
	5.2. Hasil Pengukuran Konduktivitas Listrik	49
6	PEMBAHASAN	51
	6.1. Penilaian Hasil <i>Catching</i> dengan <i>Scanning Electron Microscope (SEM)</i>	51
	6.1.1. Gambaran Pola Dasar Rhu-Mab HER2 dan Biofilm Kalsium Alginat	52
	6.1.2. Pengaruh konsentrasi alginat pada hasil <i>catching</i>	53
	6.1.3. Pengaruh suhu pada hasil <i>catching</i>	54
	6.1.4. Pengaruh konsentrasi rhu-Mab HER2 pada hasil <i>catching</i>	55
	6.2. Penilaian Hasil <i>Catching</i> dengan Pengukuran Konduktivitas Listrik	57
7	SIMPULAN DAN SARAN	60
	6.1. Simpulan	60
	6.2. Saran	61
	DAFTAR PUSTAKA	62
	LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Perbandingan konduktivitas elektrik dengan atau tanpa antibodi	46

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Skema efek seluler aktifitas <i>tyrosine kinase-HER2</i>	9
2.	Evolusi molekuler kanker payudara.	9
3.	Kerangka teori	29
4.	Kerangka konsep	30
5.	Diagram alur proses <i>catching</i>	37
6.	Diagram alur percobaan	38
7.	Antibodi saja dengan pembesaran 3.000x dan tegangan 7kv	40
8.	Antibodi saja dengan pembesaran 8.000x dan tegangan 10kv	40
9.	Alginat 3% saja, dilihat dari depan substrat kaca	41
10.	Alginat 3% saja, dilihat dari belakang substrat kaca	41
11.	Antibodi tidak dapat ter- <i>catching</i> dengan baik.	42
12.	Mulai terdapat pengelompokan antibodi yang terjebak.	43
13.	Rantai kelompok antibodi mulai muncul.	43
14.	Konsentrasi alginat yang meningkat, antibodi yang ter- <i>catching</i> juga meningkat.	44
15.	Alginat konsentrasi rendah kurang meng- <i>catching</i> antibodi	44
16.	Peningkatan suhu mengakibatkan struktur alginat menjadi lebih halus	45
17.	Peningkatan konsentrasi alginat, dilakukan pada suhu rendah	46
18.	Rantai antibodi yang terbentuk tampak teratur	46
19.	Konsentrasi rendah alginat menyebabkan hasil <i>catching</i> kurang	47
20.	Peningkatan suhu tetap kurang berperan dalam hasil <i>catching</i>	48
21.	Untaian antibodi yang ter- <i>catching</i> menjadi banyak dan relatif tak teratur	48
22.	Grafik konduktivitas listrik alginat 1,5% pada beberapa kondisi suhu	49
23.	Grafik konduktivitas listrik pada alginat 3% pada beberapa kondisi suhu	50
24.	Grafik konduktivitas listrik pada alginat 1,5% pada beberapa kondisi kadar antibodi	50

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1.	Surat Keterangan Departemen Fisika ITB	67
2.	Gambar-gambar Kegiatan Penelitian	68
3.	Data-data Hasil Pengukuran Konduktivitas Elektrik	70

**CATCHING RHU-MAB HER2 DALAM KALSIMUM ALGINAT
SEBAGAI UPAYA PEMBUATAN PROTOTIPE
IMUNOSENSOR PENDETEKSI HER2**

Eka Yudhanto

**Program Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro**

ABSTRAK

Latar belakang : Era biologi molekuler telah membawa kita memperdalam berbagai proses kehidupan di tingkat seluler termasuk di dalamnya adalah proses keganasan. Pada kanker payudara salah satu gen yang banyak diteliti adalah HER2 yang ekspresinya diyakini ikut mempengaruhi prognosis klinis penderita. Saat ini baku emas cara pendeteksian ekspresi HER2 adalah dengan metode berbasis imunohistokimia. Metode ini memerlukan laboratorium dan ahli dengan kualifikasi khusus yang tidak banyak terdapat di negara kita. Hasil pemeriksaannya pun memiliki unsur subyektif. Di lain pihak metode imunosensor makin dikembangkan sebagai cara alternatif untuk menilai proses interaksi antigen-antibodi secara cepat, mudah, dengan hasil interpretasi yang obyektif. Penelitian ini bermaksud melakukan *catching* rhu-mab HER2 dalam membran polimer kalsium alginat sebagai langkah awal pembuatan imunosensor pendeteksi HER2.

Bahan dan metoda : *Recombinand humanized anti-HER2 monoclonal antibody* (Herceptin®) yang di-*catching* dalam kalsium alginat dalam berbagai kondisi. Penelitian ini bersifat eksperimental laboratoris. Membran dibuat dengan metode penekanan. Besar sampel sesuai rumus Federer. Hasil *catching* dinilai dengan *scanning electron microscope (SEM)* dan sebagai perbandingan diukur pula konduktivitas listriknya.

Hasil : Sebanyak 27 sampel telah dibuat. Suhu 25°C menghasilkan kondisi terbaik. Terdapat kecenderungan semakin tinggi konsentrasi antibodi dan kalsium

alginat, semakin tinggi pula konduktivitas listrik yang muncul. Pemeriksaan SEM kurang dapat menunjukkan hasil *catching*.

Kesimpulan : Rhu-mab HER2 dapat di-*catching* dalam membran polimer kalsium alginat sehingga dimungkinkan pengembangannya bagi pembuatan imunosensor pendeteksi HER2.

Kata kunci : Rhu-mab HER2, kalsium alginat, imunosensor.

CATCHING RHU-MAB HER2 IN CALCIUM ALGINATE FOR CREATING IMMUNOSENSOR PROTOTYPE FOR HER2 DETECTION

Eka Yudhanto

**Master of Biomedical Science Program
Postgraduate Program of Diponegoro University**

ABSTRACT

Background: The era of molecular biology has enabled us to have an in-depth study on cellular living process, including malignancy process. In breast cancer one of the genes widely studied is HER2 where the expression of which influences the clinical prognosis of the patient. Today the gold-standard of HER2 detection using of immunohistochemistry-based method. This method requires laboratory and experts with special qualification, but unfortunately not many are available in our country. The result also allows subjective interpretation. On the other hand, the immunosensor method has been developed as an alternative method to assess the antigen-antibody interaction process quickly, easily, and objectively. This study is intended to catch rhu-mab HER2 in calcium alginate polymer membrane as a preliminary step to create immunosensor for detecting HER2.

Material and method: Rhu-mab HER2 caught in calcium alginate in different conditions. This study was an experimental laboratory study. The membrane was made by mean of pressure method. The sample taken according to Federer formula. The results of catching were evaluated with scanning electron microscope (SEM) and its electric conductivity were measured as compared.

Result: Twenty seven samples were made. Twenty five Celsius degree temperature gave the best condition result. There was a tendency of higher electric conductivity in higher antibody and calcium alginate concentration. SEM examination did not reveal the result of catching very much.

Conclusion : Rhu-mab HER2 can be caught in calcium alginate polymer membrane so that it is possible to develop immunosensor for detecting HER2.

Keywords : Rhu-mab HER2, calcium alginate, immunosensor.

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Pada penutupan milenium ini kemajuan penelitian telah membawa kita ke era biologi molekuler sebagai usaha memperdalam pengertian mengenai proses-proses kehidupan tingkat seluler diantaranya proses keganasan. Pada kanker payudara, salah satu gen yang banyak diteliti adalah HER2 yang ekspresinya meningkat pada sebagian kasus kanker payudara ^(1,2,3,4,5). Ekspresi berlebih HER2 ini ikut bertanggung jawab terhadap prognosis penderita ^(4,5,6).

Saat ini baku emas cara pendeteksian overekspresi HER2 adalah dengan berbagai metode berbasis imunohistokimia yang akan memberikan nilai semi kuantitatif terhadap ekspresi gen ini ^(1,7,8). Walau banyak jenisnya, berbagai metode pemeriksaan overekspresi HER2 masih memiliki beberapa kelemahan, seperti hanya dapat dilakukan pada laboratorium yang telah dipersiapkan khusus baik sarana maupun ahlinya, sehingga tidak banyak menjangkau penderita di daerah pelosok. Selain itu biaya pemeriksaan relatif mahal dan hasilnya mengandung unsur interpretasi yang subjektif ^(7,8,9).

Di lain pihak, kini dikembangkan suatu metode yang dinamakan biosensor. Metode ini makin luas digunakan untuk mendeteksi segala sesuatu hal yang berhubungan dengan aktifitas biologis makhluk hidup – termasuk manusia –

hingga ke tingkat molekuler ^(10,11). Biosensor untuk menilai proses antigen-antibodi disebut immunosensor ^(10,11,12,13).

Secara umum metode immunosensor sendiri menjanjikan beberapa kelebihan dibanding metode konvensional seperti ^(10,12,13).

- Mudah digunakan; karena alatnya mudah dibawa ke mana saja (*portable*).

Proses pemeriksaannya tak membutuhkan reagen maupun tahapan-tahapan khusus.

- Obyektif; karena didisain secara elektrik maka hasilnya cukup obyektif dengan nilai semikuantitatif atau bahkan kuantitatif.

- Spesifisitasnya tinggi; karena hanya bereaksi terhadap biomolekul tertentu.

- *Real time*; hasil dapat dilihat saat itu juga.

- Relatif murah; bila alat ini mampu memenuhi kriteria *multiple-use biosensor*, sehingga dapat digunakan lebih dari satu kali tanpa ada reagen atau bahan khusus habis pakai (*undisposable device*).

Dari berbagai tipe immunosensor yang ada, penulis mencoba mengembangkan metode immunosensor potensiometrik jenis immunosensor potensial membran dengan terlebih dahulu melakukan *catching* antibodi dalam suatu permukaan film polimer sebagai langkah awal dari pembuatan immunosensor pendeteksi ekspresi HER2. Dalam penelitian ini biomolekul yang dipakai adalah antibodi monoklonal rekombinan terhadap HER2 yaitu rhu-Mab HER2 yang di-*catching* dalam polimer alginat klinis. Karena kesesuaian spesifikasi molekulernya, rhu-Mab HER2 dipilih sebagai bahan penelitian ^(11,14). Demikian pula alginat yang berasal dari skeleton ganggang laut memiliki sifat-sifat fisis dan

kimiawi sebagai polimer yang cukup kuat dan fleksibel dipilih sebagai media peng-*catching* biomolekul^(15,16,17,18). Alginat sendiri murah dan banyak tersedia di pasaran. Sebagai gambaran awal pemeriksaan ekspresi HER2 yang ada saat ini membutuhkan total dana tak kurang dari Rp. 200.000,- sekali pemeriksaan, sedangkan rhu-Mab HER2 ditambah natrium alginat klinis sebagai bagian utama immunosensor membutuhkan dana sekitar Rp. 7.500.000,- yang dapat menghasilkan ratusan bio-film.

Adanya berbagai kemungkinan di atas maka penulis mencoba mengembangkan metode immunosensor potensiometrik dengan meng-*catching* rhu-Mab HER2 dalam polimer alginat untuk nantinya dapat dipakai sebagai metode alternatif baru untuk menilai ekspresi HER2.

1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah disampaikan di atas maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

- 2.1 Apakah rhu-Mab HER2 dengan konsentrasi tertentu dapat di-*catching* dalam film polimer kalsium alginat?
- 2.2 Apakah suhu pencampuran mempengaruhi *catching* rhu-Mab HER2 dalam film polimer kalsium alginat?
- 2.3 Apakah konsentrasi kalsium alginat berpengaruh terhadap *catching* rhu-Mab HER2?

1.3. TUJUAN

Menentukan dapat atau tidaknya rhu-Mab HER2 di-*catching* dalam kalsium alginat sebagai bagian prototipe piranti baru untuk mendeteksi dan menilai ekspresi HER2 pada kanker payudara. Proses *catching* sendiri dilakukan dengan memperhitungkan aspek konsentrasi antibodi, konsentrasi alginat, dan suhu pencampuran.

1.4. MANFAAT

Secara teoritis rhu-Mab HER2 sebagai antibodi yang memiliki struktur protein dapat di-*catching* dalam suatu bahan polimer tertentu seperti alginat. Hal ini diharapkan dapat bermanfaat untuk langkah pengembangan peralatan baru, yang dapat digunakan oleh dokter untuk menilai overekspresi HER2, sehingga dapat memberikan arahan terapi yang tepat sekaligus memberikan gambaran prognosis bagi penderita kanker payudara. Bagi pasien sendiri diharapkan dapat menekan biaya pemeriksaan dan memperpendek masa tunggu terhadap perkembangan penyakitnya.

Disamping itu penelitian ini diharapkan memberi wawasan baru tentang pengembangan metode biosensor di bidang ilmu kedokteran lainnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Onkogen HER2

Berbagai kemajuan onkologi yang dicapai membawa pergeseran penelitian mengenai karsinogen dan mutagen menjadi penelitian di bidang onkogen dan gen supresor tumor sekaligus tentang bagaimana sel membelah, berdiferensiasi, dan berkembang^(2,19,20). Agar dapat berkembang dengan baik sel-sel tubuh harus mampu berkomunikasi satu sama lain melalui signal-signal yang terdiri dari berbagai sitokin, hormon, faktor pertumbuhan, antigen dan molekul protein lainnya sesuai dengan ikatan protein target spesifik maupun molekul reseptor yang sesuai^(3,21,22,23). Protein yang mengatur proses-proses fisiologis organisme terutama pada membran sel diantaranya adalah *Guanine nucleotide-binding proteins (G proteins)* yang termasuk di dalamnya beberapa protein superfamili Ras^(2,21). Di antara aktivitas jalur signal Ras yaitu signal mitogenik, disediakan oleh reseptor molekul faktor pertumbuhan spesifik (ligand) yang dimiliki domain *tyrosine kinase* seperti *epidermal growth factor (EGF)* dan HER2^(4,5,22,24,25). Kinase memegang peran penting dalam jalur pensinyalan dan di antara tipe reseptor kinase terdapat *receptor tyrosine kinases (RTK)* yang merupakan poros utama pada inisiasi aktivasi seluler dan pensinyalan terhadap stimuli ekstraseluler^(24,25,26). Karena letaknya di membran sel maka reseptor HER2 memiliki domain

ligand-binding ekstraseluler, regio *membran-spanning* tunggal dan domain protein tirosin kinase sitoplasmik^(5,26).

Pemahaman biologi molekuler sekarang ini menunjukkan jika terjadi mutasi gen akan terjadi disregulasi jalur-jalur signal sehingga mengakibatkan timbulnya transformasi keganasan^(6,22). *Human epidermal growth factor receptor 2* dengan berat molekul 185-kd (HER2, p185^{HER2}) merupakan glikoprotein transmembran dengan aktivitas *tyrosine kinase*^(1,11,24,25). Dikatakan pula bahwa stimulasi jalur Ras merupakan komponen utama bagi signal proliferaatif reseptor HER2⁽²⁾. Ekspresi reseptor ini terdapat pada membran berbagai tipe sel epitelial yang dengan perantara ikatan faktor pertumbuhan spesifik mengatur berbagai aspek pertumbuhan dan pembelahan sel^(1,24). Gen HER2, disebut juga *c-erbB2* atau *neu* berlokasi pada lengan panjang kromosom 17 (17q21)⁽¹⁾. HER2 merupakan anggota famili HER, yang homolog dengan *epidermal growth factor receptor (EGFR)*^(3,6,24,25). Gen HER2 merupakan anggota sekelompok gen yang dikenal sebagai protoonkogen^(1,3,25). Protoonkogen mengkode protein-protein penting (seperti faktor pertumbuhan, reseptor faktor pertumbuhan, protein apoptotik) yang terlibat dalam pertumbuhan dan diferensiasi sel normal^(1,3).

Semenjak lahir wanita mengalami beberapa masa perkembangan payudara. Episode pertama yaitu masa pubertas. Saat itu reseptor EGF memegang peranan penting agar morfogenesis duktus dan pertumbuhan lemak mesenkim dapat berlangsung. Episode kedua terjadi pada kehamilan dan laktasi yang merupakan periode proliferasi dan ekspansi lobuloalveolar sehingga memungkinkan terproduksinya air susu. Bila perkembangan payudara dirasa

telah mencukupi maka akan terjadi *downregulation* reseptor karena pengaruh protein Cbl sehingga reseptor EGF mengalami degradasi ataupun didaur ulang (*recycled*). Regulasi otokrin dan parakrin reseptor inilah yang diyakini sebagai hal utama bagi determinasi jumlah signal yang diproduksi oleh reseptor famili erbB^(24,26). Jadi pada keadaan fisiologis aktivitas HER2 dikontrol oleh ekspresi temporal dan spasial dari ligandnya⁽⁵⁾. Namun jika protoonkogen ini mengalami mutasi, mereka akan memproduksi signal pertumbuhan di luar waktu dan jumlah yang seharusnya sehingga menyebabkan transformasi seluler dan perkembangan kanker^(1,24,25). Hasil mutasi atau perubahan protoonkogen disebut onkogen⁽¹⁾. HER2 bila bermutasi dan mengalami amplifikasi (*wild-type* erbB-2) ekspresinya akan meningkat pada sebagian kasus kanker payudara, ovarium, gaster, pankreas, kandung kencing, prostat dan glioblastoma^(1,5,22,24).

Berbagai peran HER2 dalam proses keganasan dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Meningkatkan survivalitas sel tumor.

Efek HER2 akan menahan aktivitas protein proapoptosis seperti *caspase-9* dan *tumor necrosis factor* (TNF) sehingga protein antiapoptosis seperti Bcl-X_L meningkat, akibatnya proses apoptosis akan dihambat^(5,26).

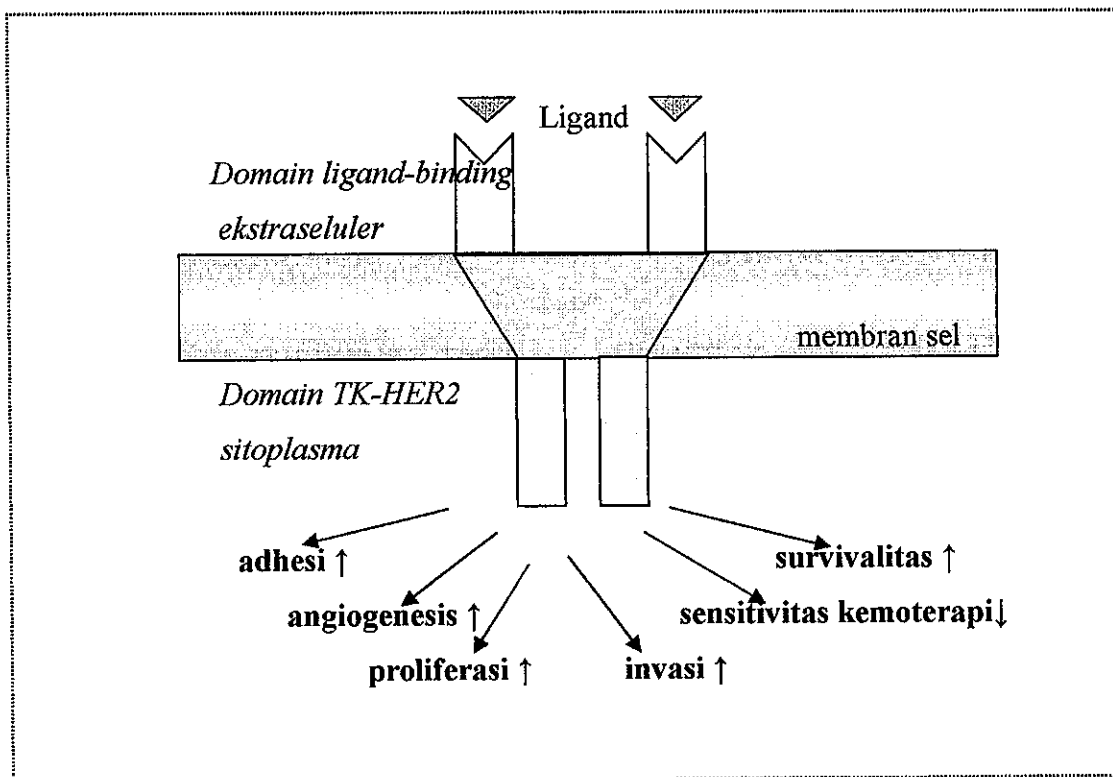
2. Membantu proses angiogenesis

Selama proses neoangiogenesis pada pertumbuhan tumor, di satu sisi sel endotel akan ikut mengekspresikan HER2, di sisi lain reseptor *tyrosine kinase* HER2 terlibat dalam produksi faktor proangiogenik utama yaitu *vascular endothelial growth factor* (VEGF)^(5,26).

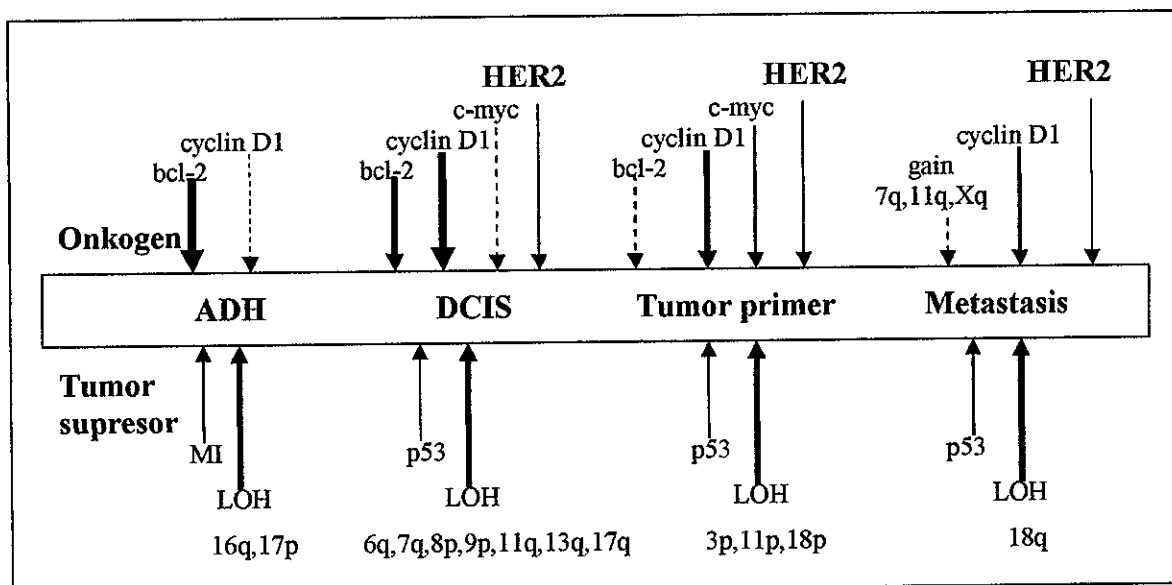
3. Merangsang migrasi dan invasi

Penelitian menunjukkan bahwa tumor yang mengekspresikan HER2 akan menjadi lebih agresif bermetastase^(3,26). Meski baru sedikit bukti, HER2 dipercaya ikut berperan dalam proses migrasi dan invasi sel tumor karena secara fungsional mengaktifkan *mitogeniactivated protein kinase* (MAPK) dan jalur *phosphatidylinositol-3 kinase* (PI-3K) yang penting dalam proses migrasi sel^(5,26).

Dari perspektif klinisi, pengetahuan tentang perubahan reseptor famili erbB pada kanker payudara amat penting untuk menilai prognosis dan keputusan terapi yang sesuai⁽²⁴⁾. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa overekspresi HER2 dapat terdeteksi pada semua stadium pada 10 - 30 % kanker payudara^(1,2,3). Ekspresi gen yang meningkat berkorelasi terhadap peningkatan aktivitas mitosis sel dan juga menunjukkan hubungan negatif terhadap status reseptor estrogen dan progesteron^(1,25,27). Overekspresi gen ini juga meningkatkan resistensi terhadap beberapa agen kemoterapi (regimen *cyclophosphamide*, *methotrexate*, *fluorouracil* – regimen CMF) dan respon yang jelek pada pemberian terapi hormonal (*tamoxifen*)^(1,3,25).



Gambar 1. Skema efek seluler aktifitas *tyrosine kinase-HER2*



Gambar 2. Evolusi molekuler kanker payudara. Peningkatan ekspresi HER2 muncul sejak fase *Ductal carcinoma in-situ (DCIS)*.

Walau demikian masih ada kontroversi yang menyatakan status HER2 bukan untuk memprediksi respon terapi endokrin karena sampel penelitian yang masih sedikit, demikian juga topoisomerase II α yang dikatakan lebih akurat sebagai prediktor terhadap resistensi kemoterapi meski hasil meta-analisisnya masih harus ditunggu^(3,7,28). Peningkatan HER2 ini juga memberi prognosis buruk, rekurensya tumor atau (*disease-free survival / DFS*) dan penurunan survivalitas (*overall survival / OS*) penderita kanker payudara^(3,4,5,20). Namun demikian sebuah penelitian di Jerman menunjukkan bahwa gen c-myc nampak lebih potensial dalam memprediksi DFS dan OS dibanding status HER2 pada kelompok penderita *node-negative breast cancer (NNBC)*⁽²⁹⁾. Overekspresi HER2 sering dijumpai pada subtype komedo dibanding subtype kribiformis *ductal carcinoma in situ (DCIS)* yaitu sebanyak 40 – 60 %^(1,3). Dikatakan bahwa overekspresi HER2 merupakan hal esensial untuk menjaga proses proliferasi sel tumor⁽⁵⁾. Di lain pihak perkembangan riset menunjukkan HER2 merupakan target potensial bagi imunoterapi spesifik bagi kanker yang mengekspresikan onkoprotein ini^(1,30,31).

2.2. Antibodi

Setiap perubahan yang terjadi pada sel tubuh akan memicu timbulnya aktivitas imun sebagai upaya untuk menjaga proses fisiologis tubuh⁽³²⁾. Antibodi sendiri terdiri dari empat sub unit polipeptida yang membangun dua rantai berat / *heavy chains (H chains)* dan dua rantai ringan / *light chains (L chains)* yang

identikal dan saling berhubungan. Berat masing-masing rantai sekitar 50k D untuk *H chain* dan 22 kD untuk *L chain*. Bagian penting molekul antibodi adalah tempat ikatan terhadap antigen (*antigen binding sites*) yang disebut fragmen Fab; yang tiap fragmen Fab terdiri dari satu *L chain* dan sebagian *H chain* ⁽¹³⁾.

Secara teoritis antibodi dapat dibuat dalam jumlah tak terbatas untuk mengenal berbagai antigen. Beberapa jenis antibodi yang dapat berespon terhadap antigen yang sama disebut antibodi poliklonal, sedangkan antibodi yang hanya dapat bereaksi terhadap satu jenis antigen disebut antibodi monoklonal (*Monoclonal antibody / Mab*) ⁽²³⁾.

2.2.1. Interaksi Antibodi-Antigen

Gaya yang terdapat pada reaksi biomolekuler bertanggung jawab terhadap stabilisasi interaksi antara antibodi dan antigen. Hingga kini dikenal empat macam gaya yaitu interaksi elektrostatik, ikatan hidrogen, interaksi Van der Waals, dan interaksi hidrofobik yang semuanya merupakan elemen-elemen pengatur afinitas molekul ^(11,12).

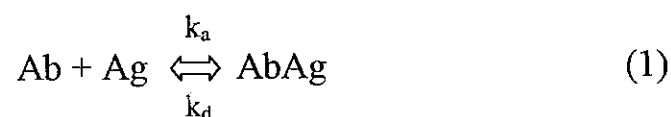
Gaya interaksi elektrostatik dapat menimbulkan kekuatan tarik maupun kekuatan tolak antar molekul bermuatan. Pada protein, kutub (polar) amin dan kelompok karbonil kerangka utama polipeptida merupakan rangkaian permanen bipolar. Demikian juga kutub dan molekul sisa yang bermuatan pada rantai samping mengandung ikatan bipolar. Ikatan hidrogen sendiri merupakan subset dari interaksi elektrostatik. Kedua jenis gaya ini terdapat pada bagian donor

proton bermuatan tinggi dan pasangan elektron bebas dari akseptor proton bermuatan tinggi. Kelompok amin merupakan donor proton, sedangkan kelompok karbonil merupakan akseptor proton. Kedua gaya ini memberikan ikatan yang kuat dalam molekul dan pada solusio aqua mereka merupakan kontributor utama bagi stabilisasi intramolekuler ^(11,12).

Gaya Van der Waals terdapat pada kutub-kutub bermuatan lemah. Kerja gaya ini adalah menginduksi kutub temporer medan elektrik di sekitar molekul. Walau interaksinya lemah, gaya kumulatif yang timbul dapat memberikan kontribusi hingga 50% dari kekuatan ikatan total antar molekul ^(11,12).

Sedangkan gaya interaksi hidrofobik bersifat tolak-menolak antara bagian non polar molekul dengan air. Berdasarkan entropi termodinamika kondisi ini menyebabkan peningkatan kekuatan stabilisasi intermolekuler ^(11,12).

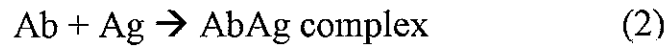
Prinsip fundamental interaksi antibodi-antigen dapat dinyatakan dengan persamaan berikut ini ^(11,12,13).



Ab menunjukkan antibodi bebas, Ag menunjukkan antigen bebas, AbAg menunjukkan komplek antibodi-antigen, k_a adalah konstanta asosiasi dan k_d adalah konstanta disosiasi ^(11,12,13).

Kekuatan interaksi antibodi-antigen diukur melalui ikatan afinitas (*binding affinity*), yang merupakan hasil penjumlahan interaksi non-kovalen antara antibodi

dan antigen yang terlibat dalam reaksi ikatan. Afinitas antibodi juga dinyatakan dalam konstanta asosiasi k_a sehingga reaksi ikatan dirumuskan ⁽¹¹⁾:



Karena k_a adalah konstanta ekuilibrium reaksi ini, maka konsentrasi ekuilibrium reaktan dan kompleks menggunakan hukum aksi massa ⁽¹¹⁾:

$$k_a = \frac{[AbAg \text{ complex}]}{[Ab] [Ag]} \quad (3)$$

Satuan k_a adalah M^{-1}

Seringkali k_d lebih dipilih dan lebih populer dalam menyatakan interaksi antibodi-antigen. k_d adalah konstanta disosiasi yang merupakan kebalikan dari k_a ⁽¹¹⁾:

$$\begin{aligned} k_d &= \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg \text{ complex}]} \\ &= 1/k_a \end{aligned} \quad (4)$$

Sehingga satuan k_d adalah M

Dalam solusi, proses asosiasi dan disosiasi berlangsung relatif cepat. Laju asosiasi merupakan proses pengikatan (pembentukan kompleks AbAg), sedangkan disosiasi adalah proses pemutusan ikatan antibodi-antigen (penguraian kompleks AbAg). Jadi afinitas yang tinggi dari antibodi-antigen membutuhkan k_d

yang rendah dan sebaliknya ⁽¹²⁾. Dalam literatur disebutkan k_d ideal untuk terjadi ikatan antibodi-antigen berkisar 10^{-5} sampai 10^{-12} M ^(11,12).

Sedangkan ikatan antara antibodi dan antigen yang terjadi dalam larutan dimana terdapat antibodi (atau antigen) yang terimobilisasi pada membran dapat dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut ⁽¹²⁾:

$$\frac{d\Gamma_1}{dt} = k_f [Ag][Ab]\Gamma_0 \quad (5)$$

Γ_1 adalah laju ikatan (*binding rate*) dari lengan tunggal antibodi dalam mengikat antigen. Γ_0 adalah konsentrasi total antigen yang terdapat dalam permukaan membran, sedangkan k_f adalah kombinasi k_1 (laju reaksi (*reaction rate*) dari satu lengan antibodi mengikat satu antigen) dan k_2 (laju reaksi dari kedua lengan antibodi dalam mengikat dua antigen). Rumus nomor 5 di atas setidaknya menjelaskan bahwa semakin besar konsentrasi antibodi atau antigen maka semakin besar pula *binding rate* yang timbul.

2.2.2. Antibodi HER2

Berdasar strategi teknik rekayasa biologi molekular kini diproduksi antibodi monoklonal yang secara alami mempunyai spesifisitas tinggi terhadap antigen yang dituju ⁽³³⁾. Antibodi monoklonal (Mab) akan melawan antigen tumor dengan cara berikatan pada daerah target spesifik kemudian melakukan lisis sel tumor baik melalui jalur *complement-mediated* ataupun jalur *antibody-dependent*

cellular cytotoxicity (ADCC) ⁽³³⁾. Mab yang memblokir aktivasi reseptor akan menyebabkan sel kanker kekurangan faktor pertumbuhan, dan karena sel kanker juga mengalami miskoordinasi, akibatnya proses kerja sinyal intraseluler mengalami gangguan maka hasil akhirnya berupa apoptosis ^(31,33). Berbeda dengan sel normal yang bila mengalami kekurangan faktor pertumbuhan, dengan koordinasi yang baik maka sel akan masuk ke fase G₀ sehingga tidak langsung mengalami apoptosis ⁽³¹⁾.

Melalui teknik DNA rekombinan Mab dari anti-HER2 tikus murine (muMab4D5) - yang efek anti tumornya telah diyakini - dicangkokkan pada immunoglobulin manusia sehingga dihasilkan *recombinand humanized* anti-HER2Mab kemudian dikenal dengan nama rhu-Mab HER2 / Trastuzumab (Herceptin[®]) yang berat molekul sekitar 145kD ^(1,14,30). Pada penelitian *solution-phase binding* menunjukkan bahwa rhu-Mab HER2 memiliki *binding affinity* tiga kali lipat dibanding antibodi asalnya (mu-Mab4D5) pada ECD HER2 yaitu dengan *dissociation constant* / $k_d = 0,1\text{nM}$ vs $0,3\text{nM}$ ⁽¹⁴⁾. Efek rhu-Mab HER2 adalah sebagai sitostatik yang akan menghentikan proliferasi sel, juga mempunyai efek potensiasi terhadap daya sitotoksik kemoterapi *doxorubicin, carboplatinum, cisplatinum* ⁽³¹⁾.

Overekspresi HER2 yang dipresentasikan ke membran sel melalui reseptor HER2 menyebabkan sistem imunitas tubuh akan memandang telah terjadi perubahan perangai sel memiliki antigen tumor. Antigen tumor tersebut akan dikenal oleh antibodi yang sesuai sehingga dapat dilisiskan ⁽³²⁾. Reseptor HER tidak hanya penting pada proses fisiologis namun juga terlibat dalam proses

malignansi ⁽⁵⁾. Berdasarkan pengertian ini reseptor HER dapat dipakai sebagai target terapi biologis kanker ^(5,30). Pada penelitian klinis fase I, II dan III trastuzumab telah menunjukkan efektivitasnya sebagai terapi bagi kanker payudara metastasis dengan HER2 positif ^(1,14,31). *Food and Drug Administration* juga telah menyetujui penggunaan trastuzumab baik sebagai obat tunggal maupun kombinasi dengan berbagai agen kemoterapi ^(1,14,34).

2.3. Metode Analisis Laboratorium HER2

Kapan sebaiknya status HER2 diperiksa, masih merupakan perdebatan ⁽²⁸⁾. Namun bila mengacu pada rekomendasi *American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, maka status HER2 harus dievaluasi pada setiap penderita kanker payudara primer, baik pada waktu diagnosis maupun saat timbulnya rekuren ^(14,28). Sedangkan *National Comprehensive Cancer Network (NCCN 2000)* merekomendasikan pemeriksaan status HER2 sebagai tes diagnostik rutin pada semua stadium kanker payudara ⁽¹⁴⁾.

Berbagai metode pemeriksaan untuk mengukur overekspresi HER2 yang sering digunakan saat ini yaitu :

2.3.1. Imunohistokimia (*Immunohistochemistry/ IHC*)

Cara ini menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal untuk mendeteksi ekspresi protein spesifik (termasuk reseptor HER2) dari jaringan

maupun sel ^(1,24). Ikatan antibodi divisualisasikan lewat reaksi kromogenik yang hasilnya dilihat dengan mikroskop cahaya. Metode ini dinilai sensitif, cepat, mudah untuk diinterpretasikan dan dapat dilakukan baik pada jaringan potong beku maupun blok parafin ⁽¹⁾. Keterbatasannya adalah hilangnya determinan antigenik karena fiksasi yang tak tepat terhadap jaringan, interpretasi yang sifatnya subyektif, kelemahan standardisasi yang dapat menyebabkan variasi hasil pewarnaan dan variabilitas interobserver ^(1,7).

Metode *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)* memungkinkan pemeriksa mendeteksi dan melihat deretan asam nukleat spesifik dari sediaan jaringan maupun sel. Jika molekul DNA yang dilabel sesuai atau terdeteksi dengan *fluorescent tag*, hibridisasi target dapat dilihat dengan mikroskop fluoresen ^(1,35). Pemeriksaan FISH memiliki keuntungan cepat, hanya membutuhkan sedikit contoh tumor dan mampu mendeteksi amplifikasi gen walau dalam kadar rendah, sehingga sering digunakan sebagai pemeriksaan lanjutan bila IHC hasilnya meragukan ^(1,8,24). Kerawanan pada pewarnaan seperti pada metode imunohistokimia lebih sedikit karena molekul DNA lebih tahan terhadap kerusakan pada kesalahan proses pewarnaan. Interpretasinya juga objektif karena menghitung secara tepat signal hibridisasi tiap nukleus sel ^(1,35). Walau demikian metode ini membutuhkan fasilitas laboratorium yang canggih, teknik yang rumit dan biayanya relatif mahal ^(1,7).

Teknik *Chromogenic In Situ Hybridization (CISH)* mirip dengan FISH. Namun visualisasinya tak membutuhkan mikroskop fluoresen sehingga lebih mudah dikerjakan dibanding FISH. Selain itu sediaan yang diolah dengan metode

ini dapat disimpan dalam waktu yang lama sehingga dapat diperiksa ulang di lain waktu dan hasil komparasi penilainya pun hampir sebanding dengan FISH. Walau demikian metode ini masih membutuhkan laboratorium khusus dan masih memerlukan penilaian rutin pada praktik klinikal sebelum dapat dinyatakan sebagai metode alternatif terhadap FISH ^(8,35).

2.3.2. Teknik Amplifikasi Gen

Teknik selanjutnya adalah amplifikasi gen yaitu dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Keuntungan teknik cukup menggunakan sejumlah kecil contoh jaringan dan berbagai kesalahan pada prosedur manual dapat diturunkan. Kelemahannya adalah *post-quantification* produk PCR dapat mengurangi keakuratan pengukuran dari jumlah produk per siklusnya. Untuk mengatasi kelemahan di atas, kini dikembangkan teknik *real-time PCR* yang menggunakan deteksi fluoresen maka visualisasi selama proses amplifikasi dapat diamati. Walau demikian teknik ini juga membutuhkan fasilitas laboratorium khusus yang tidak mungkin tersedia di berbagai tempat ^(8,36).

2.3.3. Enzyme Immunoassays (EIA)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *extracellular domain (ECD)* HER2 lepas dari permukaan sel kanker asal ⁽¹⁾. Berdasarkan pengetahuan ini EIA dipakai untuk mendeteksi ECD HER2 pada serum maupun contoh jaringan.

Teknik ini memiliki keuntungan cukup mudah tekniknya, memberikan gambaran 'real time' status HER2 tumor dan menggunakan metode kuantitatif sehingga meningkatkan akurasinya ^(1,8). Namun cara ini mengandung kelemahan seperti harus adanya laboratorium khusus dan tidak dapat menggambarkan status HER2 sel tumor individual; pasien dengan overekspresi rendah reseptor HER2 dapat memiliki kadar ECD HER2 serum yang sebanding dengan pasien dengan overekspresi reseptor yang tinggi ⁽⁷⁾. Metode ini belum disetujui oleh FDA dalam kapasitasnya untuk menilai overekspresi HER2 ⁽¹⁾.

2.3.4. Laser Capture Microdissection (LCM)

Metode baru ini secara akurat melakukan separasi tumor, stroma, sel normal dari sediaan biopsi tunggal. Analisis spesimen yang dihasilkan mampu mengetahui perubahan genom, ekspresi yang berubah dari sel, aktivasi dan signal dari berbagai spesimen tumor. Sehingga diharapkan pula dapat mendeteksi amplifikasi maupun overekspresi HER2 ⁽⁹⁾.

Penilaian overekspresi HER2 dikatakan berguna untuk seleksi pasien yang diharapkan mendapatkan keuntungan dengan imunoterapi. Overekspresi dan amplifikasi HER2 mengindikasikan prognosis yang jelek bagi pasien kanker payudara dengan *node-negative*; yang keduanya juga berhubungan dengan sensitivitas ataupun resistensi terhadap beberapa obat kemoterapi. Level HER2

yang menyebar dalam serum berguna untuk mendeteksi rekurensi ataupun terjadinya metastasis penyakit ⁽¹⁾.

2.4. Biosensor

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) merekomendasikan definisi dan batasan-batasan mengenai biosensor sebagai berikut ⁽¹⁰⁾:

- *Chemical-sensor* adalah alat yang mampu mentransform informasi kimia mulai tentang konsentrasi tiap komponen spesifik suatu zat hingga analisis komposisi total spesimen menjadi suatu signal yang dapat diinterpretasikan. *Chemical-sensor* biasanya terdiri dari dua komponen dasar yang berhubungan secara serial yaitu: sistem pengenalan kimiawi (molekuler) / *chemical (molecular) recognition system* dan tranduser fisikokimia / *physicochemical transducer*.
- Sistem pengenalan akan menterjemahkan informasi dari domain biokimia yang biasanya berupa analisis konsentrasi, menjadi signal kimia atau fisik dengan sensitivitas tertentu.
- Tranduser akan mentransfer signal dari *domain output* pada sistem pengenalan ke domain elektrik.
- Biosensor merupakan salah satu jenis dari *chemical-sensor*.
- Biosensor merupakan kesatuan integral alat yang terdiri dari reseptor dan tranduser yang mampu memberikan informasi analitik secara kuantitatif atau

semi-kuantitatif dari elemen pengenalan biologis / *biological recognition element*.

- Biosensor harus tidak menggunakan reagen (*reagenless*) dalam proses analisisnya, walau demikian ko-substrat bebas seperti air dan oksigen masih dapat dipakai.
- Peralatan yang tidak memeriksa spesifisitas biologis meski digunakan untuk memantau proses biologis seperti sensor *in vivo* pH atau oksigen bukan termasuk biosensor.
- Biosensor dapat bersifat *multiple-use biosensor* yang dapat digunakan berkali-kali maupun *single-use biosensor* yang hanya dapat digunakan sekali.

Dapat dikatakan pula bahwa biosensor merupakan perangkat atau instrumen analitik yang berfungsi untuk mendeteksi (*sensing*) zat biokimia tertentu. Biosensor menggunakan biomolekul yang merupakan *biotic elements* seperti enzim, antibodi, sel, jaringan, dan mikroorganisme sebagai komponen sensor yang utama ^(11,13,37). Imobilisasi biomolekul memiliki peran yang sangat penting pada perangkat biosensor. Salah satu pengertian dari imobilisasi biomolekul adalah *catching* biomolekul pada permukaan transduser tertentu menjadi suatu bioreseptor. Proses ini dilakukan agar biomolekul tersebut dapat digunakan berulang kali untuk proses sensing dan reaksi yang terjadi pada biomolekul tersebut dapat memberi pengaruh langsung secara fisik (elektrik) pada transduser tersebut ^(13,37).

2.5. Imunosensor

Komponen biologis pada biosensor dapat berupa enzim, antibodi, sel utuh, dan reseptor ^(11,12,13). Secara umum bila biosensor digunakan untuk mendeteksi reaksi antigen-antibodi disebut imunosensor ^(10,11,12). Metode *immunoassay* konvensional yang membutuhkan keahlian dan waktu tertentu untuk menganalisis hasil pemeriksaan. Imunosensor memberikan kemudahan bagi para ilmuwan dan klinisi untuk mengukur dengan tepat variasi analit berbagai campuran kompleks zat dengan berbagai konsentrasi ⁽¹²⁾.

Imunosensor bersandar pada selektivitas alamiah yang tinggi dari sistem pengenalan antibodi-antigen pada spesimen pemeriksaan. Untuk kepentingan imunosensor, antibodi (atau antigen) diimobilisasi dalam suatu permukaan solid misalnya film polimer ⁽¹²⁾. Reaksi kopling antibodi – antigen dapat menghasilkan muatan listrik tertentu ⁽¹¹⁾. Pada teknologi imunosensor yang digandengkan dengan teknologi semikonduktor, proses pendeteksian yang digunakan diantaranya dengan mengukur perubahan konstanta dielektrik yang ditimbulkan akibat transfer elektron akibat reaksi kopling antibodi-antigen tersebut ^(11,13).

Sedangkan klasifikasi biosensor / imunosensor berdasarkan metodenya adalah sebagai berikut ^(10,12):

- biosensor elektrokimia / elektrobiokimia :
 - potensiometrik :
 - imunosensor potensial elektroda
 - imunosensor potensial transmembran

- amperometrik :
 - label substansi redox aktif elektrokemikal
 - label enzim dengan elektrode oksigen
 - label enzim dengan produk aktif elektrokemikal
- imunosensor *ion-selective field effect transistor* (ISFET), ada juga yang menggolongkan dalam imunosensor potensiometrik
- biosensor akustik piezoelektrik
- biosensor termometrik
- biosensor reflektometrik dan elipsometrik

Lebih jauh masing-masing tipe dibagi menjadi *direct* dan *indirect immunosensors* ^(11,12).

Direct immunosensor didisain untuk mendeteksi timbulnya formasi kompleks antibodi-antigen yang akan menimbulkan sinyal perubahan fisik. Sinyal-sinyal tersebut dapat berupa perubahan potensial elektrode, potensial membran, piezofrekuensi intrinsik, ataupun perubahan properti optik yang dideteksi dengan berbagai peralatan yang sesuai ⁽¹²⁾.

Indirect immunosensor menggunakan antibodi atau antigen yang dilabel dengan zat tertentu sehingga proses ikatan antibodi-antigen dapat dilihat. Hasil yang timbul kemudian dikonfirmasi dengan perangkat potensiometrik, amperometrik, maupun optik ⁽¹²⁾.

Berikut ini beberapa penjelasan mengenai immunosensor^(10,11,12).

2.5.1. Immunosensor Elektrokimia / Elektrobiokimia

Kelompok immunosensor ini pada dasarnya terdiri dari dua jenis yaitu potensiometrik dan amperometrik.

Sensor potensiometrik mengukur perubahan potensial pada elektrode akibat reaksi ionik. Terdapat tiga tipe sensor jenis ini, yaitu immunosensor potensial transmembran yang mengukur beda potensial yang terjadi antara antibodi (atau antigen) yang terimobilisasi pada membran dengan antigen (atau antibodi) pada larutan. Contohnya adalah sensor pemeriksa golongan darah. Kemudian immunosensor potensiometrik yang didasari atas determinasi potensial dari elektrode. Contohnya sensor untuk *human chorionic gonadotropin (hCG)*. Jenis ketiga adalah *ion-selective field effect transistor (ISFET) immunosensor*. Prinsip kerja ISFET adalah mendeteksi variasi medan voltage dengan aliran arus minimal. Potensial lokal dihasilkan ion-ion pada larutan. Contohnya alat deteksi kadar heparin.

Sensor amperometrik akan mengukur arus yang terjadi akibat reaksi oksidasi atau reduksi (*redox*). Terdapat tiga jenis alat pada metode ini. Label enzim dengan elektrode oksigen. Enzim akan diasosiasikan dengan perubahan konsentrasi oksigen yang dapat dimonitor dengan elektrode oksigen. Contoh penggunaannya adalah immunosensor α -fetoprotein (AFP). Jenis kedua adalah penggunaan substansi reaksi (*redox*) yang dipakai sebagai label untuk

electrochemical immunoassays. Contoh pemakaiannya adalah pendeteksi kadar lidokain dalam plasma. Dan yang ketiga adalah label enzim dengan produk aktif elektrokemikal. Misalnya *alkaline phosphatase* digunakan sebagai label dalam *enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)* yang mengkatalisis proses hidrolisis fenil fosfat.

2.5.2. Imunosensor Akustik Piezoelektrik

Piezomaterial -seperti kristal quartz yang telah diasah- meresonansikan gelombang frekuensi spesifik karena eksitasi elektrik. Hal ini mendasari pembuatan imunosensor akustik piezoelektrik. Orientasi bentuk kristal, ketebalan material, geometri metal transduser akan menghasilkan gelombang akustik frekuensi tertentu. Perubahan massa kristal -karena deposit presipitat yang melingkupinya- akan mengubah frekuensi gelombang yang timbul. Contoh imunosensor jenis ini adalah alat pendeteksi hCG dan adenosine 5'-phosphate.

2.5.3. Imunosensor Termometrik

Peralatan ini menggunakan prinsip bahwa reaksi biokimia akan menghasilkan panas, yang nilainya proporsional dengan besarnya reaksi tersebut. Alat ini diterapkan pada analisis klinis darah dan urin, juga pada deteksi proses fermentasi dan pengaruh toksin pada mikroorganisme dengan melihat panas yang muncul akibat perubahan metabolisme.

2.5.4. Imunosensor Reflektometrik dan Elipsometrik

Imunosensor reflektometrik didasari bahwa substansi yang di absorpsi pada permukaan di antara dua media akan menghasilkan indeks bias yang berbeda, kemudian perbedaan ini diukur dan dianalisis. Sedangkan elipsometrik mengukur perubahan fase dan amplitudo refleksi cahaya untuk mendeteksi molekul biologis.

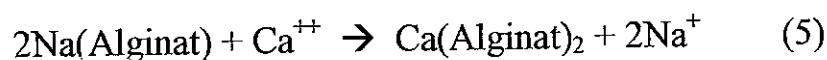
Di antara berbagai jenis biosensor di atas, yang banyak dikembangkan adalah biosensor elektrokimia khususnya potensiometrik ^(10,15). Jadi biosensor potensiometrik yang digunakan untuk mendeteksi proses antigen-antibodi disebut imunosensor potensiometrik dan pada imunosensor potensial transmembran, antibodi (atau antigen) diimobilisasi dalam suatu permukaan film polimer ^(10,12,15).

Berbagai jenis polimer telah dikembangkan sebagai wadah *catching*. Keunggulan polimer adalah karena sifatnya yang mudah dipasangkan dengan bahan-bahan organik sehingga kombinasi yang terjadi memberikan sejumlah besar kemungkinan penerapannya sebagai bioresseptor ^(10,37).

Salah satu jenis polimer yang dikembangkan oleh bidang Fisika Material adalah polimer yang berasal dari alginat. Alginat, biasanya tersedia dipasaran berupa asam alginat dan garam alginat yaitu *sodium alginate* (natrium alginat). Secara alamiah untaian polisakarida ditemukan terkurung menjadi kerangka berbagai macam jenis tanaman laut dan alga. Untaian polisakarida ini kemudian

dikenal dengan nama alginat yang memiliki karakteristik yang cukup kuat namun fleksibel^(16,17).

Sifat kelarutan alginat dalam air tergantung kandungan garam di dalamnya. Garam amonia, natrium dan logam alkali lainnya menyebabkan larut dalam air, sedangkan garam dengan kation polivalen seperti kalsium menyebabkan tidak larut dalam air. Sehingga kation polivalen akan memberikan respon yang baik untuk proses *cross-linking* pada pembuatan molekul polimer. Jadi untuk meningkatkan stabilitas struktur polimernya, ikatan terhadap ion natrium monovalen (+1) diganti dengan ikatan ion divalen kalsium (+2) dengan cara menyemburkan larutan CaCl_2 pada natrium alginat sehingga terbentuk struktur polimer kalsium alginat^(15,17,18). Karena hasil yang diinginkan berupa lapisan film yang tipis, maka proses selanjutnya adalah pencetakan dan penekanan gel polimer alginat pada media datar seperti kaca^(15,18).



Permeabilitas molekul polimer alginat sendiri tidak bergantung pada kondisi pengimobilisasian yang dikenakan padanya. Lebih dari itu ukuran pori-pori dapat dikontrol dengan baik karena alginat bukan merupakan kopolimer acak sehingga memiliki berat molekul tertentu sesuai tujuan aplikasinya. Struktur polimer gel alginat juga bersifat termostabil pada suhu 0 hingga 100 °C sehingga tidak mencair bila dipanaskan dalam rentang suhu di atas^(18,38).

Semenjak pengembangannya, alginat telah diterapkan cukup luas di bidang teknis seperti bahan cetak pada pembuatan gigi palsu, campuran kertas dan

produk tekstil dan bidang klinis seperti cangkang obat kapsul, pelembut es krim pengental dan bahan makanan^(18,38).

Entrapment molekul enzim dalam polimer alginat sudah berhasil dilakukan sehingga kemungkinan pemakaian polimer ini yang digabung dengan antibodi menjadi hal yang dapat dijajaki dengan memperhatikan beberapa hal dalam proses polimerisasi yaitu konsentrasi berbagai zat dan suhu optimum pada saat polimerisasi dilakukan^(15,18,39).

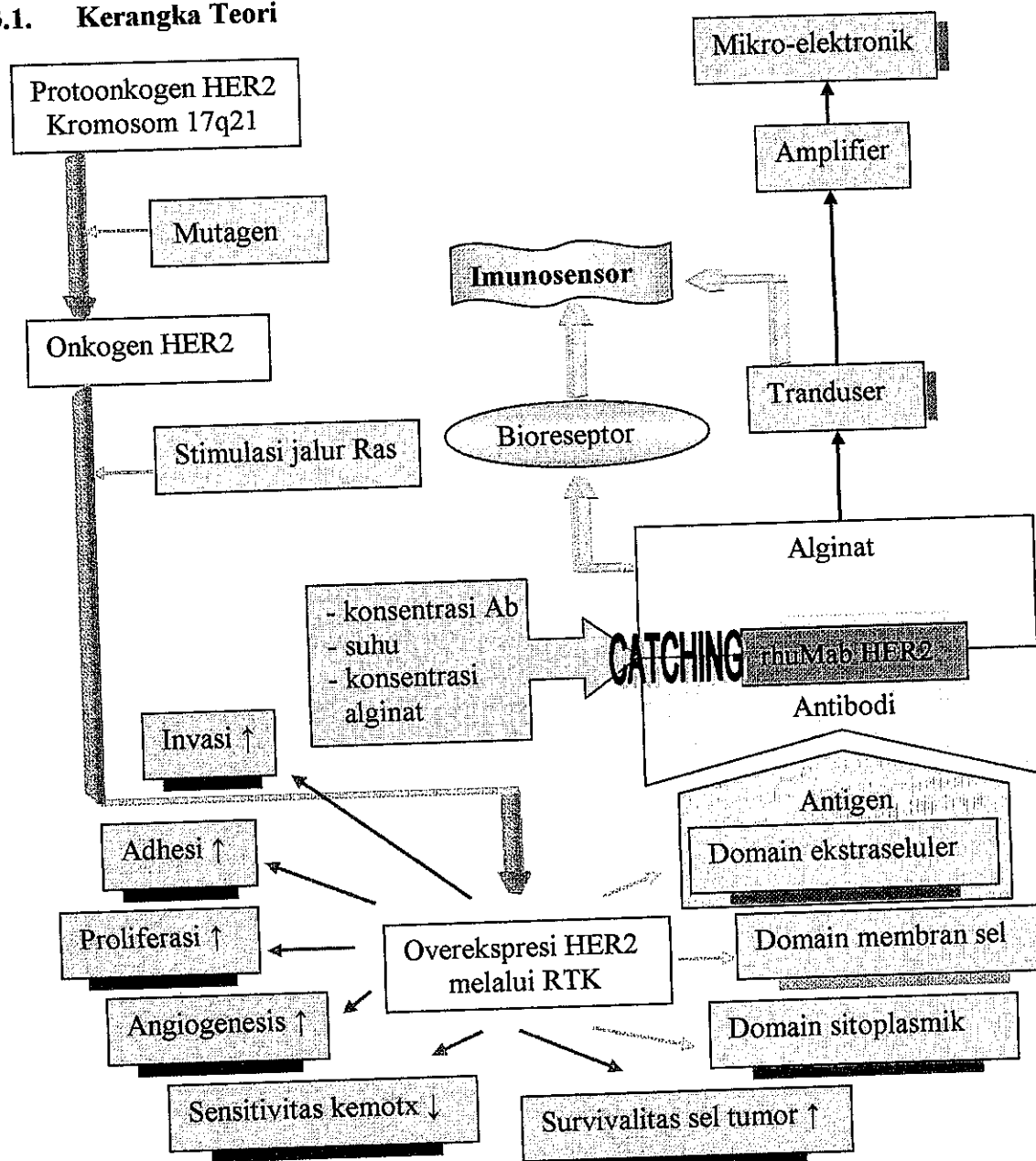
Cara kerja immunosensor potensiometrik berdasarkan adanya perubahan potensial yang terjadi ketika antibodi yang diimobilisasi dalam polimer berikatan dengan antigen pada fragmen Fab^(10,11,13). Fragmen Fab sangat penting pada aplikasi biosensor karena di sinilah terdapat daerah antigenik sebagai tempat berinteraksi antara antibodi dengan antigen yang sesuai⁽¹³⁾.

Seperti diketahui antibodi, seperti protein lainnya, merupakan polielektrolit yang bila berikatan dengan antigen akan terjadi perubahan muatan, perubahan potensial yang terjadi ini dipengaruhi konsentrasi antigen dan antibodi yang ada. Karena muatan listrik yang timbul amat kecil (1-5mV) maka membran tempat antibodi diimobilisasi harus cukup tipis. Setelah menjalani proses amplifikasi dan penyesuaian diharapkan arus listrik tersebut dapat diinterpretasikan. Selain itu tingkat kemurnian antibodi harus tinggi agar afinitasnya terhadap antigen dapat terjadi⁽¹¹⁾. Afinitas yang diijinkan yaitu berkisar $10^{-4} - 10^{-8}M$, sedangkan rhu-Mab HER2 memiliki afinitas $10^{-8}M$, sehingga dapat dipakai sebagai antibodi kandidat pada percobaan ini^(11,14).

BAB 3

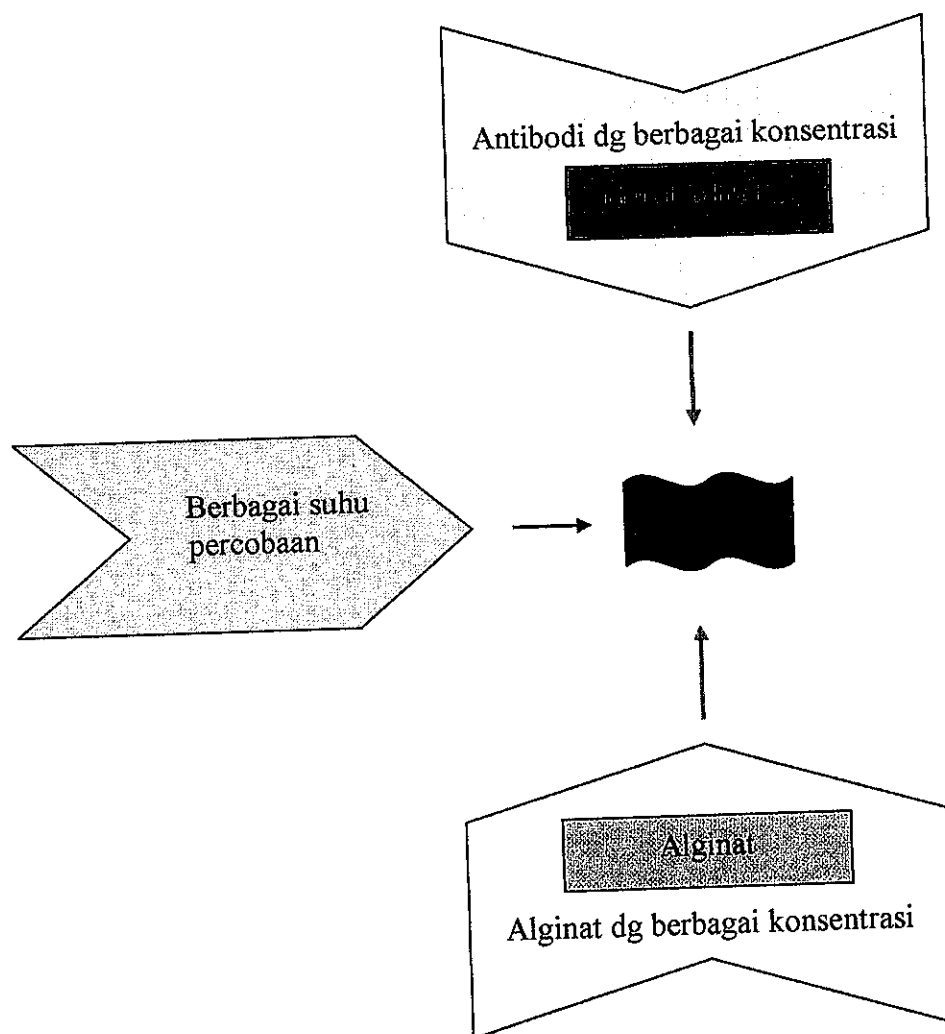
KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Teori



Gambar 3. Kerangka teori

3.2. Kerangka Konsep



Gambar 4. Kerangka konsep

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Desain Penelitian

Penelitian eksperimental laboratoris dengan desain rancangan faktorial (*factorial experimental design*)⁽⁴⁰⁾. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kapabilitas suatu antibodi untuk di-*catching* dalam suatu membran polimer.

Sebagai pembuktian dari rumusan masalah penelitian ini, dipakai dua cara yaitu dengan menjawabnya langsung dari hasil percobaan dan memperhatikan pengaruh-pengaruh perlakuan untuk melihat estimasi yang timbul⁽⁴⁰⁾.

4.2. Tempat Penelitian

Laboratorium Polimer Departemen Fisika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Institut Teknologi Bandung.

Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi, Bandung.

4.3 Waktu Penelitian

Januari 2004 – Juni 2004

4.4. Batasan Sampel Penelitian

4.4.1. Bahan

Antibodi yang dipakai : *lyophilized recombinand humanized anti-HER2 monoclonal antibody (lyophilized rhuMab HER2)* (Herceptin®, buatan Roche, Swiss).

Film yang dipakai berasal dari Natrium-alginat klinis buatan PT Bratachem.

4.4.2. Pengambilan Sampel

Sampel dipilih langsung dari bahan-bahan yang sudah terstandardisasi.

4.4.3. Besar Sampel

Besar sampel minimal (n) yang diperlukan untuk uji eksperimental sesuai dengan rumus Federer⁽⁴⁰⁾:

$$(\sum t - 1)(n - 1) \geq 15 \quad (6)$$

t_1 = konsentrasi antibodi : 2,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 3,8 mg/ml larutan, → maka $t_1 =$

3 t_2 = konsentrasi alginat : 1,5%; 3%; dan 4,5%, → maka $t_2 = 3$

t_3 = suhu pelarutan : 15°C; 25°C; dan 35°C, → maka $t_3 = 3$

Dari perhitungan rumus :

$$(t_1+t_2+t_3 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(3 + 3 + 3 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$8 (n - 1) \geq 15$$

$$8n - 8 \geq 15$$

$$8n \geq 15 + 8$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,87$$

karena n bilangan bulat maka n minimal untuk tiap perlakuan = 3

Variabel bebas (konsentrasi antibodi, konsentrasi alginat, dan suhu pelarutan) = 3; dengan masing-masing diberi sub variabel 3; dan dari rumus ditemukan n minimal = 3; maka jumlah sampel minimal total yang dibutuhkan adalah : $3 \times 3 \times 3 = 27$.

4.5. Identifikasi Variabel

4.5.1. Variabel Bebas

Konsentrasi antibodi, konsentrasi kalsium alginat, dan suhu percobaan.

4.5.2. Variabel Tergantung

Hasil *catching* antibodi dalam film alginat.

4.5.3. Kebutuhan Alat dan Bahan

4.5.3.1. Alat :

1. Gelas ukur dan bejana berbagai ukuran
2. Pipet mikrodosis
3. Pengaduk
4. *Vacuum chamber*
5. *Vacuum pump*
6. *Vacuum desiccator*
7. Kotak *fiberglass* kedap udara
8. *Object glass*
9. *Sprayer*
10. *Scanning electron microscope (SEM)* JEOL 6360 LA
11. Pengatur suhu
12. Timbangan elektronik

4.5.3.2. Bahan :

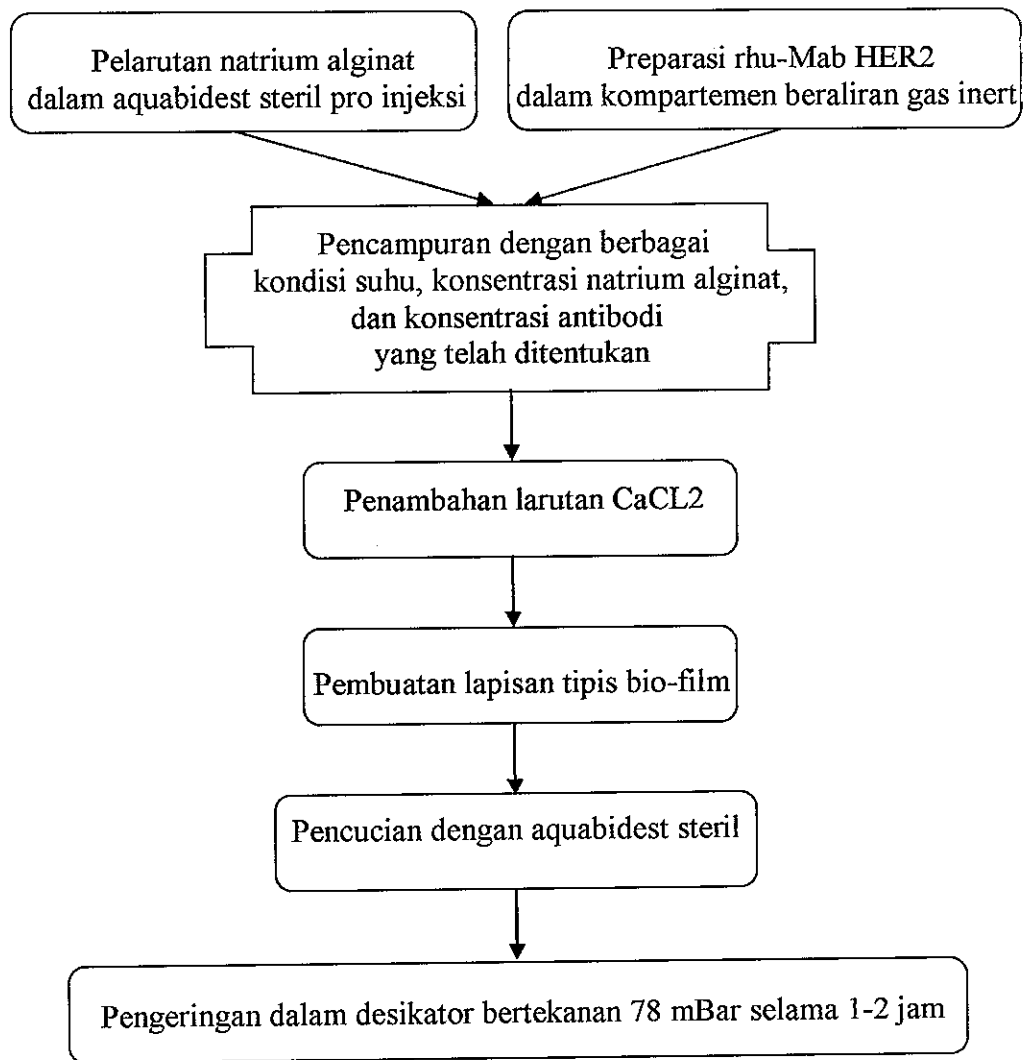
1. *lyophilized* rhu-Mab HER2 sediaan 21 mg/ml (Herceptin[®])
2. Natrium alginat tipe klinis buatan PT Bratachem
3. *Aqua bidest steril for injection*
4. Gas inert
5. Larutan CaCl₂ standard
6. Serbuk higroskopis dua jenis
7. Regulator untuk *flowmeter gas*

4.6. Pelaksanaan Proses *Catching* Antibodi

1. Menyiapkan larutan alginat berbagai konsentrasi yaitu 1,5% , 3% dan 4,5%, dengan cara menggunakan *aqua bidest steril for injection* 100 ml dengan Na-Alginat 1,5 gr, 3 gr dan 4,5 gr. Aduk merata secara terus-menerus, dengan pengadukan yang cepat dan konstan dapat mempercepat proses pelarutan. Aduk hingga tidak tersisa gumpalan-gumpalan alginat.
2. Preparasi antibodi dalam ruangan *fiberglass* berisi gas inert dengan maksud mendapatkan sejumlah antibodi yang diinginkan tanpa tercampur dengan zat kontaminan lain.
3. Menambahkan antibodi (rhuMab HER2) sebanyak yang diinginkan, sejumlah 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, dan 3,8 mg/ml larutan *aqua bidest steril for injection*. Aduk hingga merata.
4. Mengingat antibodi stabil dalam keadaan suhu 2 s/d 8 °C sehingga terimmobilisasi dengan baik, maka langsung dilanjutkan segera dengan pembuatan lapisan film tipis. Sedangkan suhu lingkungan percobaan masing-masing dijaga pada suhu 25° C, 15°C, dan 35°C.
5. Meneteskan Na-alginat + antibodi pada permukaan substrat kaca. Setelah itu semprotkan larutan CaCl₂ pada permukaan lapisan tersebut.
6. Penyemprotan akan mengakibatkan terjadinya pertukaran ion Na⁺ dengan Ca²⁺ sehingga terbentuk ikatan silang yang diantaranya terjebak antibodi

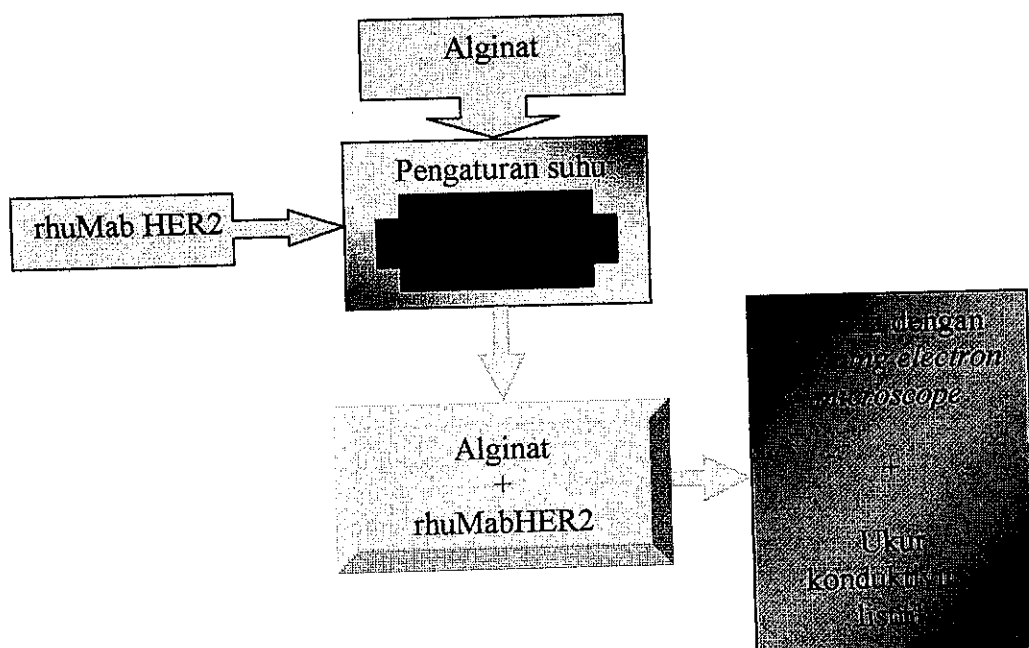
dalam keadaan yang stabil. Lapisan yang terbentuk dilakukan penekanan dengan substrat kaca agar dihasilkan lapisan tipis bio-film. Kemudian diamkan sekitar 5-10 menit.

7. Lanjutkan dengan pencelupan kedalam *aqua bidest steril pro injection*, untuk mengangkat garam-garam yang terbentuk, agar menghasilkan film yang kering dan tidak lengket.
8. Setelah proses pencelupan selesai film dikeringkan dengan cara divakumkan selama 0.5-1 jam dalam desikator bertekanan 78 mBar.



Gambar 5. Diagram alur proses *catching*

Setelah serangkaian proses di atas dilakukan maka dapat kita lihat hasil film yang terjadi dengan proses *scanning* melalui SEM untuk mengetahui keberadaan dan posisi antibodi yang telah terjebak didalam film tersebut sekaligus mengukur konduktivitas elektriknya, sebagaimana penelitian sejenis yang pernah dilakukan ⁽¹²⁾.



Gambar 6. Diagram alur percobaan

BAB 5

HASIL PERCOBAAN

Dari rancang desain dan jumlah sampel penelitian, dapat diuraikan kombinasi percobaan sebagai berikut :

A: konsentrasi rhuMab HER2, terdiri dari :

A1 = konsentrasi 2,0 mg/ml

A2 = konsentrasi 2,5 mg/ml

A3 = konsentrasi 3,8 mg/ml

B : konsentrasi kalsium alginat, terdiri dari :

B1 = konsentrasi 1,5%

B2 = konsentrasi 3,0%

B3 = konsentrasi 4,5%

C : suhu waktu pencampuran, terdiri dari :

C1 = suhu 15°C

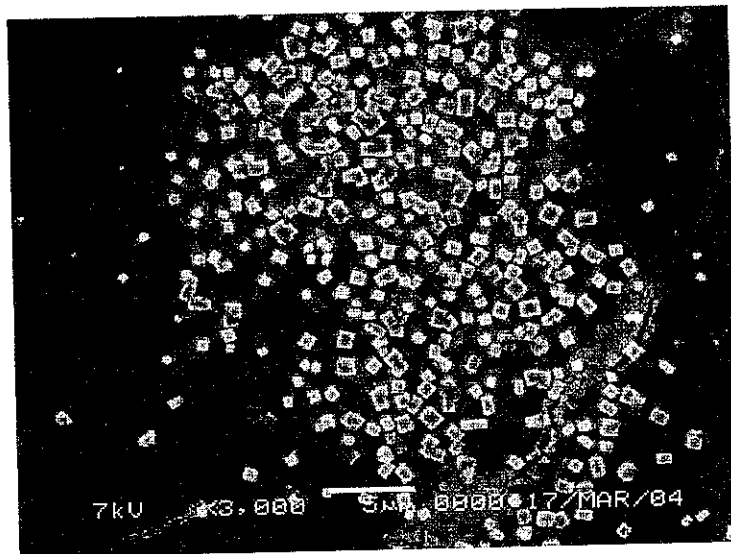
C2 = suhu 25°C

C3 = suhu 35°C

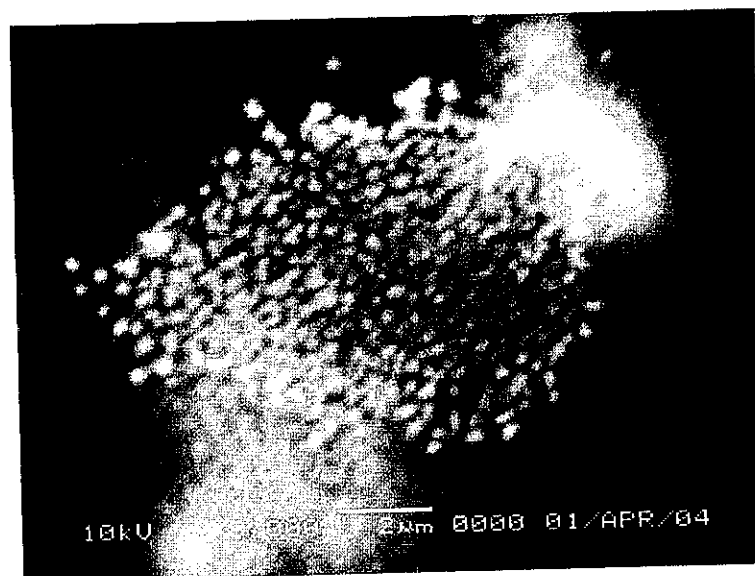
Namun karena kendala waktu dan terbatasnya dana maka diputuskan tidak semua hasil percobaan dilakukan foto SEM. Oleh karenanya pada masing-masing kelompok akan diambil satu contoh untuk diperiksa dengan SEM dengan pertimbangan dipilih konsentrasi antibodi standard (2,5 mg/ml), suhu standard

25°C, konsentrasi alginat standard (3%), dan tampilan makroskopis dari bio-film yang terjadi namun masih dengan mempertimbangkan variasi ketiga hal di atas.

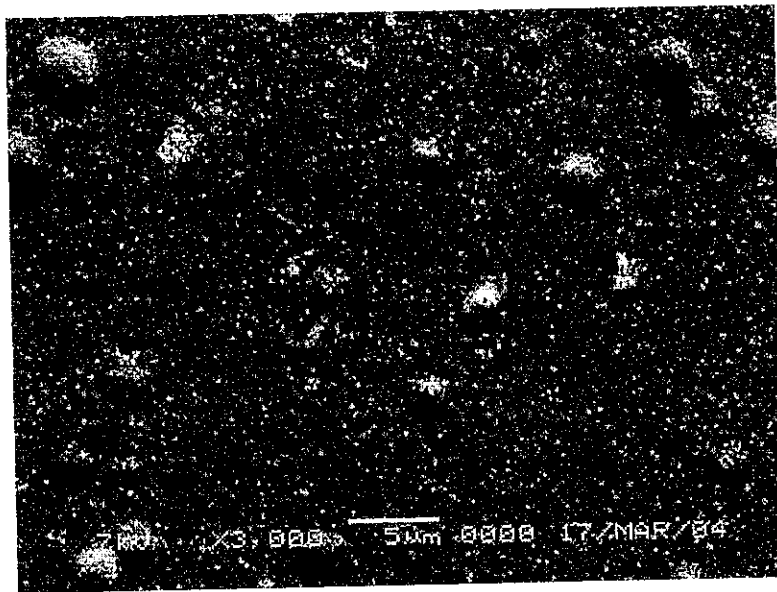
5.1. Hasil Foto SEM



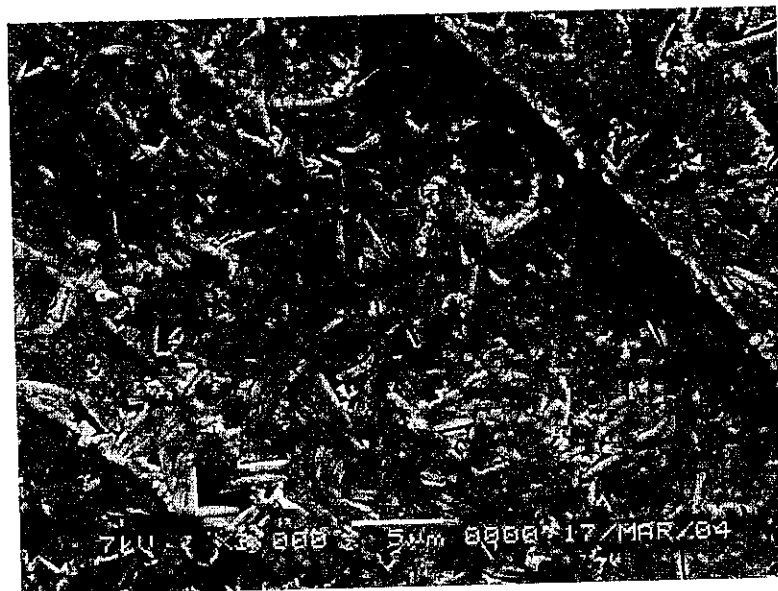
Gambar 7. Antibodi saja dengan pembesaran 3.000x dan tegangan 7kv.



Gambar 8. Antibodi saja dengan pembesaran 8.000x dan tegangan 10kv



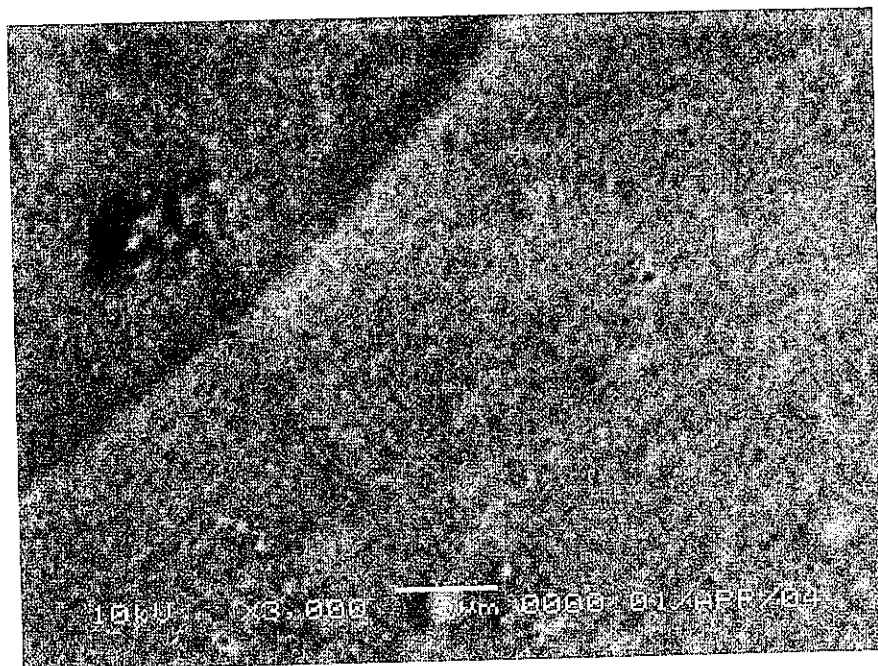
Gambar 9. Alginat 3% saja, dilihat dari depan substrat kaca



Gambar 10. Alginat 3% saja, dilihat dari belakang substrat kaca.

Hasil A1B1C1 → tidak diperiksa

Hasil A1B1C2 →



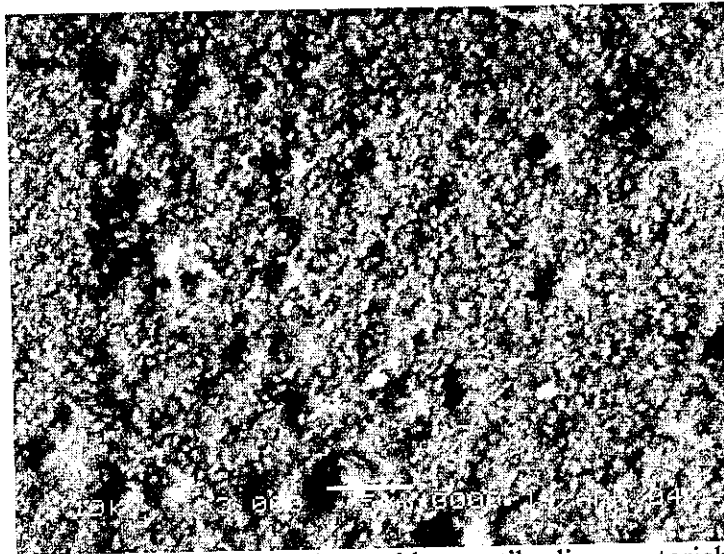
Gambar 11. Antibodi tidak dapat *ter-catching* dengan baik. Menunjukkan gambaran yang relatif homogen.

Hasil A1B1C3 → tidak diperiksa

Hasil A1B2C1 → tidak diperiksa

Hasil A1B2C2 → tidak diperiksa

Hasil A1B2C3



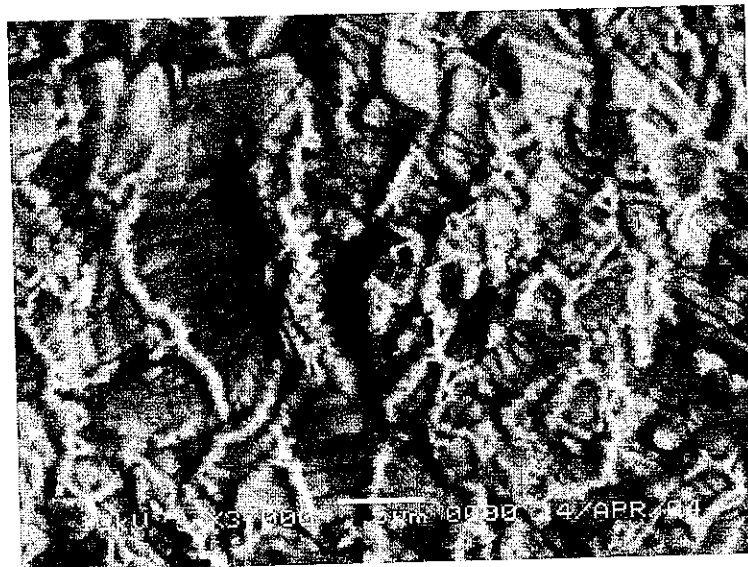
Gambar 12. Mulai terdapat pengelompokan antibodi yang terjebak. Perubahan konsentrasi alginat dan suhu menunjukkan perubahan struktur bio-film.

Hasil A1B3C1



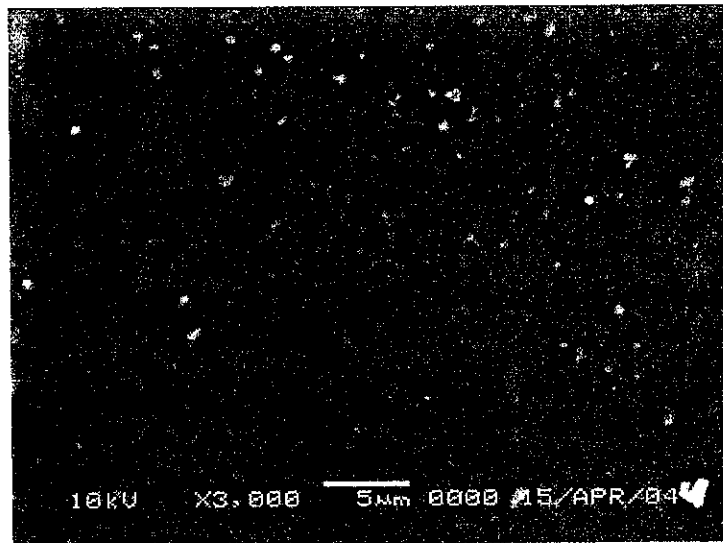
Hasil tidak diperiksa

Hasil A1B3C2



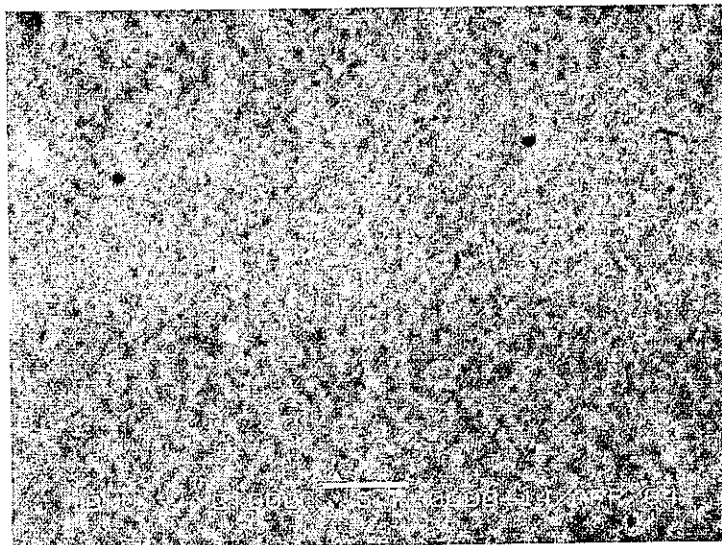
Gambar 13. Rantai kelompok antibodi mulai muncul meski masih sedikit, dilihat dari balik substrat kaca.

Hasil A1B3C3 →



Gambar 14. Konsentrasi alginat yang meningkat disertai peningkatan antibodi yang *ter-catching*.

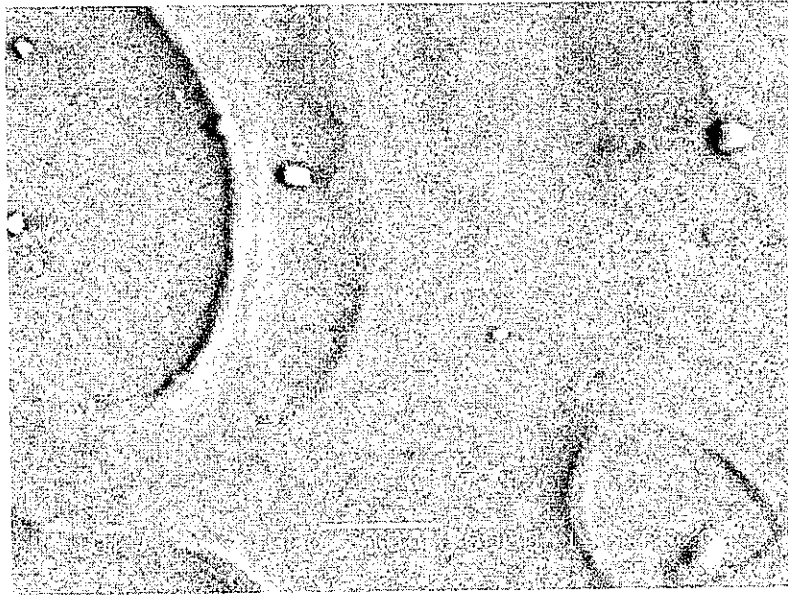
Hasil A2B1C1 →



Gambar 15. Suhu dan alginat konsentrasi rendah kurang meng-*catching* antibodi.

Hasil A2B1C2 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A2B1C3 →



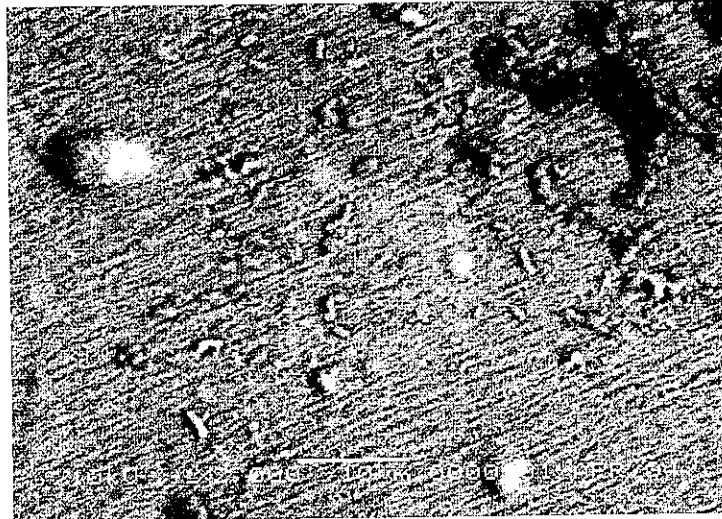
Gambar 16. Peningkatan suhu mengakibatkan struktur alginat menjadi lebih halus sehingga proses *catching* kurang, dilihat dari balik substrat kaca.

Hasil A2B2C1 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A2B2C2 → Hasil tidak diperiksa

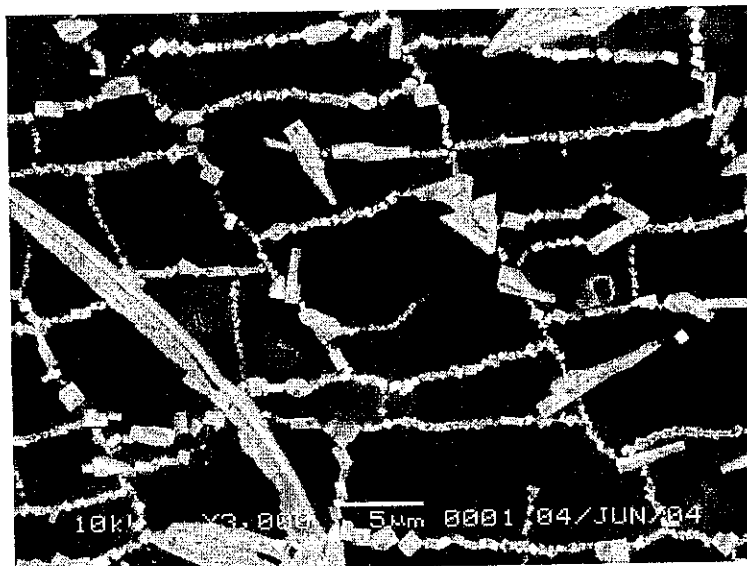
Hasil A2B2C3 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A2B3C1



Gambar 17. Peningkatan konsentrasi alginat, dilakukan pada suhu rendah menunjukkan adanya hasil *catching*

Hasil A2B3C2

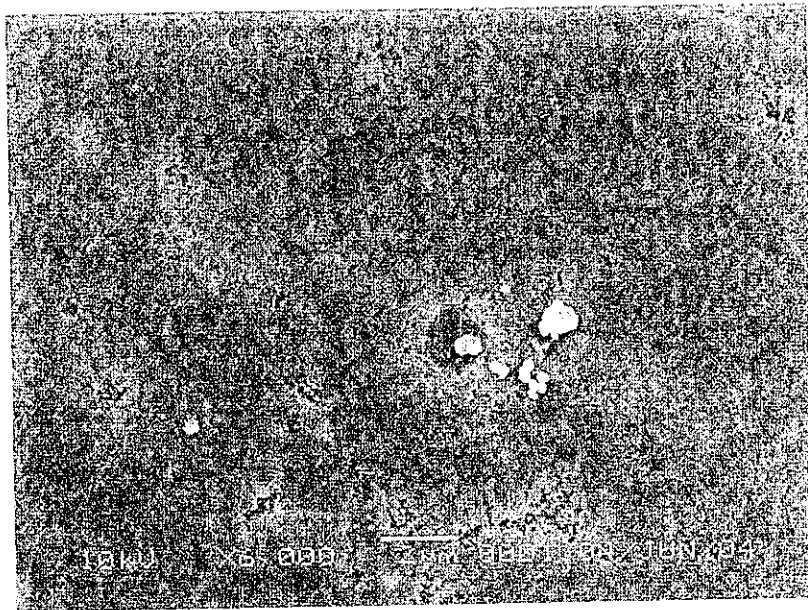


Gambar 18. Rantai antibodi yang terbentuk tampak teratur. Pada suhu standard konsentrasi antibodi sedang, dan konsentrasi alginat yang tinggi.

Hasil A2B3C3 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B1C1 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B1C2 →



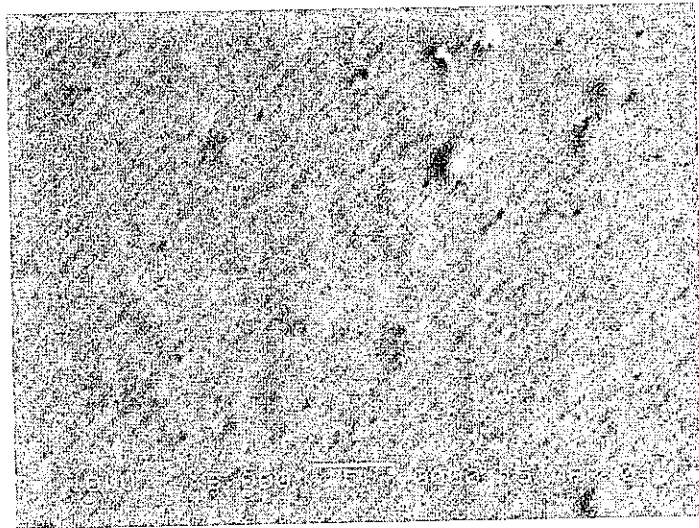
Gambar 19. Konsentrasi rendah alginat menyebabkan hasil *catching* kurang.

Hasil A3B1C3 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B2C1 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B2C2 → Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B2C3



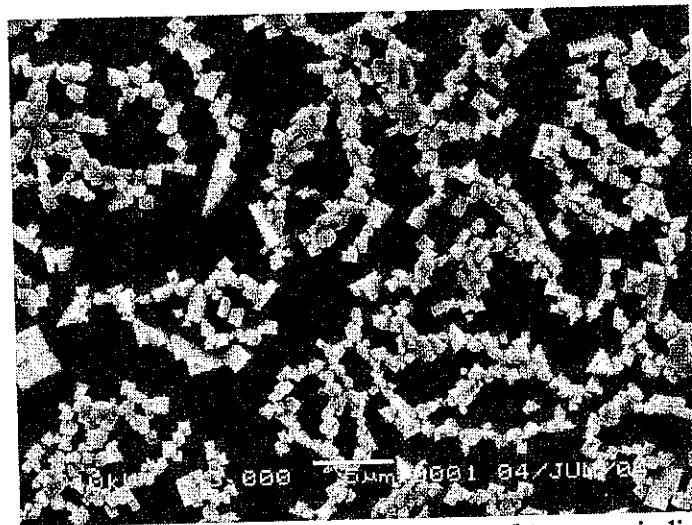
Gambar 20. Meski kadar antibodi ditambah, peningkatan suhu tetap kurang berperan dalam hasil *catching*.

Hasil A3B3C1



Hasil tidak diperiksa

Hasil A3B3C2



Gambar 21. Tampak untaian antibodi yang ter-*catching* menjadi banyak dan relatif tak teratur.

Hasil A3B3C3



Hasil tidak diperiksa

5.2. Hasil Pengukuran Konduktivitas Listrik

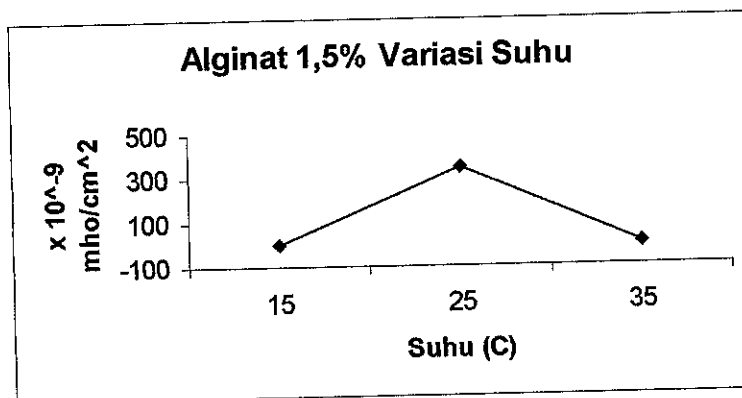
Dari hasil eksperimen dilakukan pula pengukuran konduktivitas elektrik pada beberapa sampel. Hal ini bertujuan untuk semakin memperkuat hasil yang telah didapat mengingat gambaran hasil *catching* rhu-Mab HER2 hingga sekarang belum ada di literatur.

Pengukuran kelompok pertama alginat 3% tanpa atau dengan antibodi 2,5 mg/ml dan suhu 25°C Sampel A2B2C2:

Tabel 1. Perbandingan konduktivitas elektrik dengan atau tanpa antibodi

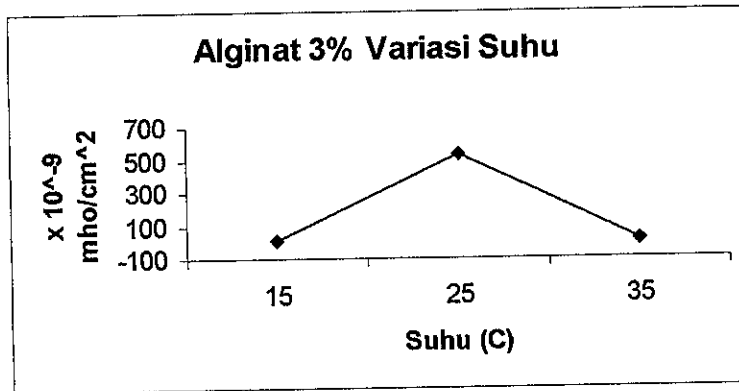
Konduktivitas elektrik	Antibodi (-)	Antibodi (+)
Mho/cm ²	$3,93 \times 10^{-10}$	$1,61 \times 10^{-7}$

Pengukuran kelompok kedua adalah konduktivitas elektrik pada alginat 1,5% ,antibodi 2,5 mg/ml dengan berbagai kondisi suhu:



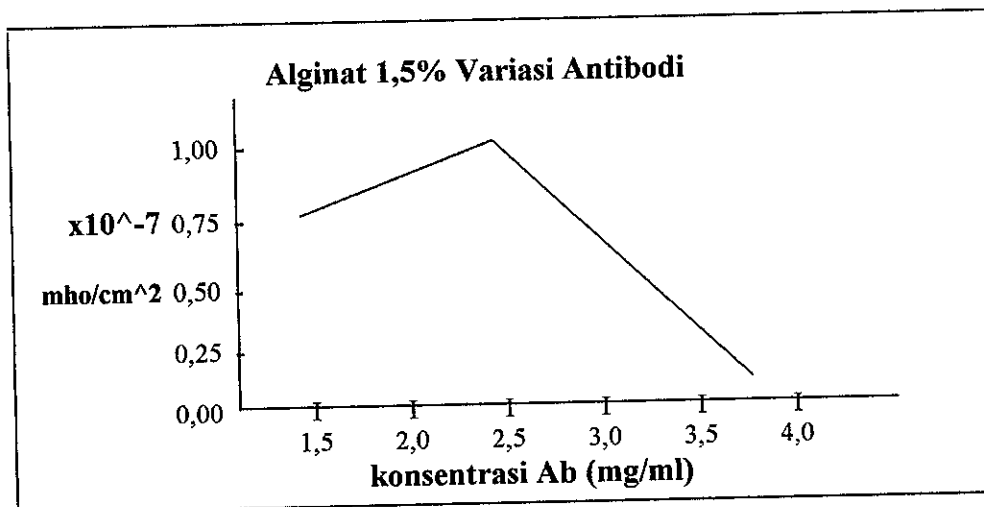
Gambar 22. Grafik konduktivitas listrik alginat 1,5% pada beberapa kondisi suhu.

Pengukuran kelompok ketiga adalah konduktivitas elektrik pada alginat 3% , antibodi 2,5 mg/ml dengan berbagai kondisi suhu:



Gambar 23. Grafik konduktivitas listrik pada alginat 3% pada beberapa kondisi suhu.

Pengukuran kelompok keempat adalah konduktivitas elektrik pada alginat konsentrasi tetap 1,5% , suhu tetap 25°C, sedangkan kadar antibodi diubah:



Gambar 24. Grafik konduktivitas listrik pada alginat 1,5% pada beberapa kondisi kadar antibodi

BAB 6

PEMBAHASAN

Sesuai dengan penjelasan terdahulu maka hasil dan pembuktian penelitian ini memakai dua cara yaitu dengan menjawabnya langsung dari hasil percobaan dan memperhatikan pengaruh-pengaruh perlakuan untuk melihat estimasi yang timbul ⁽⁴⁰⁾. Hasil penelitian yang telah dibuktikan dengan pemeriksaan *Scanning electron Microscope (SEM)* dan pengukuran konduktivitas elektrik dapat dibahas sebagai berikut :

6.1. Penilaian Hasil *Catching* dengan *Scanning Electron Microscope (SEM)*

Sebagaimana diketahui pemeriksaan SEM membutuhkan pemberian tegangan listrik tertentu untuk menghasilkan semburan elektron pada spesimen agar didapatkan topografinya. Untuk menghasilkan gambar yang lebih jelas tegangan listrik harus ditingkatkan, namun ini dapat berakibat kerusakan spesimen baik akibat tidak dapat menahan bombardemen elektron, maupun kerusakan karena proses kehampaan udara yang terjadi ^(41,42,43,44). Kelemahan SEM oleh para ahli dikoreksi dengan diciptakannya *Enviromental Scanning Electron Microscope (ESEM)*. Pada ESEM suatu kotak (*chamber*) khusus dipakai untuk melindungi spesimen dari bombardemen elektron. Spesimen juga tidak

harus dibuat hampa udara sehingga lebih tahan untuk diperiksa dan gambaran yang dihasilkanpun lebih jelas^(43,44).

6.1.1 Gambaran Pola Dasar Rhu-Mab HER2 dan Biofilm Kalsium Alginat

Hasil *catching* rhu-Mab HER2 hingga saat akhir dibuatnya penelitian ini belum pernah didokumentasikan. Sehingga bagaimana gambaran hasil *catching* akan diperlihatkan dengan SEM. Sebelumnya akan dicari gambaran pola dasar rhu-Mab HER2 terlebih dahulu (**Gambar 7**). Pada pembesaran 3000x dengan pemberian tegangan 7 kv hanya tampak konglomerasi antibodi berbentuk bintik-bintik. Hal ini dikarenakan perbesaran yang dikenakan masih kurang. Namun ketika dicoba untuk membuat perbesaran yang lebih kuat yaitu 8000x dengan pemberian tegangan 10 kv, sebelum tercapai fokus yang tepat spesimen ternyata tidak mampu bertahan dalam tegangan setinggi itu sehingga terbakar (**gambar 8**). Dari beberapa kali percobaan ternyata banyak spesimen hanya mampu bertahan pada tegangan 7 kv sehingga gambaran antibodi tidak mungkin didapatkan secara soliter dan utuh.

Karena alasan bersifat teknis diputuskan pemeriksaan pada percobaan ini dilakukan dengan SEM. Tegangan listrik optimum yang dipakai sebesar 7-10kv dengan perbesaran 3000x untuk menilai ada tidaknya, banyak sedikitnya, dan konfigurasi dari konglomerasi antibodi dalam film kalsium alginat untuk menyimpulkan hasil *catching*.

Kemudian dicari pula gambaran pola dasar biofilm kalsium alginat dengan metode yang sama di atas. **Gambar 9** menunjukkan pemeriksaan kalsium alginat 3% tanpa pemberian antibodi. Pada foto tersebut tampak gambaran yang homogen dari biofilm alginat. Sedangkan gambaran bulatan-bulatan pada spesimen merupakan gelembung udara yang terjebak di antara biofilm dan substrat kaca. Kemudian kami berusaha membuktikan dengan membalik spesimen untuk melihat kembali pola dasar yang terbentuk (**gambar 10**). Ternyata tampak ada cekungan bulat yang memang menunjukkan udara yang terjebak. Sedangkan struktur biofilm tampak terlipat-lipat menempel pada kaca (tampak paling jelas garis memanjang yang melintang diagonal). Namun dari kedua pemeriksaan di atas kami sudah memiliki gambaran dasar yang relatif stabil dan homogen dari biofilm kalsium alginat.

6.1.2. Pengaruh konsentrasi alginat pada hasil *catching*

Alginat memiliki properti menjadi media bagi *entrapment* berbagai molekul. Juga untaian alginat dikenal memiliki karakteristik yang cukup kuat namun fleksibel^(16,17,18). Namun properti alginat sebagai media bagi *entrapment / catching* rhu-Mab HER2 belum pernah dibuktikan. Melalui protokol yang telah disepakati polimer alginat dicoba kemampuannya bagi proses *catching* antibodi di atas.

Pada **gambar 11** yang merupakan konsentrasi alginat terendah yaitu 1,5% (dengan konsentrasi antibodi terendah dalam suhu standard) tampak gambaran

homogen yang relatif mirip dengan gambar 9, sehingga dinyatakan antibodi tidak dapat ter-*catching*.

Kemudian **gambar 12** adalah hasil foto pada spesimen dengan peningkatan konsentrasi alginat menjadi 3% dan suhu 35°C, meski kadar antibodi yang diberikan masih minimal. Pada foto tersebut tampak antibodi belum ter-*catching* dengan baik karena konglomerasinya masih acak.

Ketika kadar alginat (sebagai “wadah”) ditingkatkan lagi menjadi 4,5% tampak untaian rantai kelompok antibodi mulai terbentuk (**gambar 13**). Tekstur biofilm tampak kasar dan ‘bersegmen-segmen’ karena difoto dari balik substrat kaca.

Hasil terbaik tampak pada **gambar 18** yaitu dengan konsentrasi alginat tertinggi dan suhu kamar, untaian kelompok-kelompok antibodi tampak teratur dalam jumlah yang banyak.

6.1.3. Pengaruh suhu pada hasil *catching*

Karakteristik yang kuat polimer alginat juga ditunjukkan dengan sifatnya yang termotabil pada suhu 0 hingga 100 °C sehingga tidak mencair bila dipanaskan dalam rentang suhu di atas ^(18,38). Sedangkan rhu-Mab HER2 diketahui mampu bertahan pada suhu kamar bila tidak lebih dari 24 jam ⁽¹⁴⁾. Sehingga percobaan dengan waktu beberapa jam dan menggunakan kisaran suhu 15°C hingga 35°C, baik polimer alginat maupun rhu-Mab HER2 masih dapat bertoleransi.

Pada berbagai variasi suhu (**gambar 12, 13, 14, 15 dan 18**) menunjukkan bahwa suhu standard (suhu 25°C) merupakan kondisi suhu yang ideal bagi *catching* antibodi meski kadar antibodi yang dikenakan diubah konsentrasinya sedangkan kadar alginat rendah cenderung hasil *catching* sedikit dan kadar alginat yang lebih tinggi cenderung hasil *catching* meningkat.

Suhu percobaan yang dinaikkan (35°C) akan menghasilkan struktur biofilm yang lebih halus karena proses pengadukannya lebih rata. Namun akibatnya celah tempat antibodi terperangkap menjadi berkurang sehingga antibodi yang ter-*catching* tidak banyak (**gambar 16 dan 20**). Pada **gambar 17** suhu rendah (15°C) menjadi salah satu faktor yang mengakibatkan tekstur biofilm menjadi relatif kasar. Kedua hal di atas semakin membuktikan suhu standard merupakan suhu ideal.

6.1.4. Pengaruh konsentrasi rhu-Mab HER2 pada hasil *catching*

Entrapment biomolekul dalam polimer alginat sudah berhasil dilakukan sehingga kemungkinan pemakaian polimer ini terhadap rhu-Mab HER2 dapat dijajaki dengan memperhatikan beberapa hal dalam proses polimerisasi yaitu konsentrasi berbagai zat dan suhu optimum pada saat polimerisasi dilakukan (15,18,39). Seperti diketahui antibodi monoklonal secara alami mempunyai spesifisitas tinggi terhadap antigen yang dituju (33). Dari kedua prinsip di atas dapat diperkirakan rhu-Mab HER2 tidak akan berlaku proses ikatan selayaknya antibodi - antigen dengan kalsium alginat. Karena biofilm yang dibuat

mengandung celah-celah mikroskopis, maka diharapkan antibodi akan terperangkap di dalamnya.

Pada **gambar 11** yang merupakan konsentrasi antibodi terendah (dengan konsentrasi alginat terendah dalam suhu standard) tampak gambaran homogen yang relatif mirip dengan gambar 9, sehingga dinyatakan antibodi tidak dapat *catching*.

Kemudian **gambar 12** adalah hasil foto pada spesimen dengan kadar antibodi masih minimal namun dengan peningkatan konsentrasi alginat menjadi 3% dan suhu 35°C. Pada foto tersebut tampak antibodi belum *catching* dengan baik karena konglomerasinya masih acak.

Sedangkan **gambar 15** menunjukkan peningkatan kadar antibodi akan meningkatkan hasil *catching* yang tampak berupa bintik-bintik kelompok antibodi yang lebih banyak dibanding yang kadar antibodi rendah.

Gambar 17 sebenarnya menunjukkan hasil *catching* yang baik namun rantai kelompok antibodi tak terbentuk. Setelah kami runut ulang hal ini dikarenakan kadar alginat yang tinggi tidak disertai cukup pengeringan sehingga mengganggu proses *catching* dan formasi biofilm digambarkan dengan banyaknya gelembung udara dan air serta tekstur yang tidak homogen.

Meski kadar antibodinya tertinggi namun karena alginatnya dalam konsentrasi terendah maka antibodi yang *catching* menjadi sedikit (tampak pada **gambar 19**).

Gambar 21 menunjukkan percobaan pada kadar antibodi tertinggi, kadar alginat tertinggi, dan dilakukan pada suhu standard. Tampak jelas untaian

konglomerasi antibodi yang jauh lebih banyak dibanding gambar 13 maupun gambar 18.

Perlu diketahui bahwa pada beberapa kondisi kadar antibodi A1 diubah dari 2,0 mg/ml menjadi 1,5 mg/ml. Hal ini semata-mata untuk mencapai rentang yang cukup dari A2 (2,5 mg/ml) dan menghemat waktu serta biaya tanpa mengubah prinsip dasar bahwa terjadi perlakuan yang bermaksud mengubah gradasi konsentrasi.

6.2. Penilaian Hasil *Catching* dengan Pengukuran Konduktivitas Listrik

Seperti diketahui pada biosensor yang juga merupakan *chemical-sensor* maka komponen sistem pengenalan (*recognition system*) akan menterjemahkan informasi dari domain biokimia yang terdiri dari analisis konsentrasi, menjadi signal fisika pada domain elektrik^(10,11,13).

Dari hasil eksperimen dilakukan pengukuran konduktivitas elektrik pada beberapa sampel. Hal ini bertujuan untuk semakin memperkuat hasil yang telah didapat mengingat gambaran hasil *catching* rhu-Mab HER2 hingga sekarang belum ada di literatur.

Pengukuran kelompok pertama alginat 3% tanpa atau dengan antibodi 2,5 mg/ml dan suhu 25°C (sampel A2B2C2). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa penambahan antibodi akan meningkatkan konduktivitas elektrik bio-film ($3,93 \times 10^{-10}$ mho/cm² dibanding $1,61 \times 10^{-7}$ mho/cm²).

Pengukuran kelompok kedua adalah konduktivitas elektrik pada **alginat 1,5%** ,antibodi 2,5 mg/ml dengan **berbagai kondisi suhu**. Pengukuran kelompok ketiga adalah konduktivitas elektrik pada **alginat 3%** , antibodi 2,5 mg/ml dengan **berbagai kondisi suhu**. Dari hasil pengukuran kelompok kedua dan ketiga nampak bahwa suhu 25°C merupakan suhu ideal yang menghasilkan konduktivitas elektrik tertinggi yaitu $1,09 \times 10^{-7}$ mho/cm² untuk kadar alginat 1,5% dan $1,62 \times 10^{-7}$ mho/cm² untuk kadar alginat 3%.

Pengukuran kelompok keempat adalah konduktivitas elektrik pada alginat konsentrasi tetap 1,5% , suhu tetap 25°C, sedangkan **kadar antibodi diubah-ubah**. Dari hasil pengukuran kelompok keempat ternyata *catching* antibodi memiliki titik jenuh tertentu, sehingga bila dilakukan penambahan antibodi hasil konduktivitasnya menurun. Titik optimalnya didapatkan pada konsentrasi rhu-Mab HER2 sekitar 2,5 mg/ml.

Hasil penelitian ini disadari masih jauh dari sempurna mengingat adanya berbagai keterbatasan baik dari sarana, biaya, waktu , rancangan penelitian, teknik pemeriksaan, maupun kemampuan pada diri peneliti sendiri. Peneliti sekedar berusaha mengemukakan sedikit dasar-dasar ilmiah onkogen dan antibodi HER2 di satu sisi dengan kemungkinan dikembangkannya imunosensor pendeteksi ekspresi HER2 dengan terlebih dahulu mengetahui kemampuan ter-*catching*-nya rhu-Mab HER2 dalam kalsium alginat.

Di samping itu percobaan ini diharapkan dapat memberi wawasan baru bagi pengembangan metode biosensor lainnya di bidang kedokteran sebagai salah satu cara diagnostik yang cepat, mudah, dan bila dibuat secara massal akan dapat menekan biaya produksi.

BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1. Simpulan

1. Rhu-Mab HER2 dapat di-*catching* dalam kalsium alginat sebagaimana dibuktikan dengan pemeriksaan *scanning electron microscope (SEM)*, meski tidak dapat menampilkan secara jelas gambaran antibodi.
2. Hasil pengukuran konduktivitas elektrik mampu memberikan gambaran mengenai hasil *catching* antibodi.
3. Pada kondisi suhu ruangan didapatkan kondisi optimum bagi proses *catching* sebagaimana yang ditunjukkan dalam pengukuran konduktivitas listrik.
4. Konsentrasi alginat yang rendah menyebabkan konsentrasi antibodi yang ter-*catching* juga sedikit.
5. Konsentrasi alginat yang terlalu tinggi akan menyebabkan antibodi yang ter-*catching* makin banyak, namun susunan antibodi menjadi sangat tidak teratur.
6. Konsentrasi antibodi memiliki keseimbangan ideal tertentu, yang dibuktikan peningkatan kadar antibodi sampai titik tertentu menghasilkan hasil *catching* dan konduktivitas listrik optimal, setelah itu nilainya cenderung menurun.

7.2. Saran

1. Perlu dilakukan percobaan lanjutan untuk mencari kondisi keseimbangan yang ideal antara konsentrasi antibodi dan konsentrasi alginat dengan jumlah sampel yang lebih banyak.
2. Perlu dilakukan percobaan tahap berikutnya untuk ‘mempertemukan’ antibodi yang telah ter-*catching* dengan antigen tumor baik secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk dapat membuktikan kegunaan dari peralatan baru ini.
3. Percobaan ini diharapkan dapat memberi wawasan baru bagi pengembangan metode biosensor di bidang kedokteran sebagai salah satu cara diagnostik yang cepat, mudah, dan bila dibuat secara massal akan dapat menekan biaya produksinya.
4. Penemuan ini setidaknya dapat membuka peluang untuk dipertimbangkan mendapat hak paten dalam kerangka prinsip dasar *catching* suatu zat pada membran polimer sebagai suatu komponen bioreseptor dalam metoda biosensor.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anderson SM, Everett T. HER-2/neu Oncoprotein: A new target in the treatment of breast cancer. LabCorp®. [on line] : http://www.oncogene.com/technical/pdf/BC_Trtmnt.pdf.
2. Kretzchmar M. Transforming growth factor- β and breast cancer transforming growth factor- β /SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 107-15. [on line]: <http://www.breast-cancer-research.com/content/2/2/107>
3. Bergstein I. Molecular alterations in breast cancer. In: Bowcock AM, editor. *Breast cancer, molecular genetics, pathogenesis, and therapeutics*, 1st ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1999: 143-70.
4. Perkins AS, Stern DF. Molecular biology of cancer: oncogenes. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Principles & practice of oncology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publisher, 1997: 79-102.
5. Holbro T, Civenni, Hynes NE. The erbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2003; 284: 99-110.
6. Bernstein JL, López-Carrillo L, Wang L. The epidemiology of her2/neu and p53 in breast cancer. *Salud Publica Mex* 1999; 41 suppl 2: S114-S123.
7. Di Leo A, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. *Oncology* 2002; 63 (suppl 1): 25-32.
8. de Vijver MV. Emerging technologies for HER2 testing. *Oncology* 2002; 63 (suppl 1): 33-8.
9. Michener CM, Ardekani AM, Petricoin III EF, Liotta LA, Khon EC. Genomics and proteomics: application of novel technology to early detection and prevention of cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2002; 26: 249-55.
10. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (technical report). *Pure Appl. Chem.* 1999; 71: 2333-48.

UPT-PUSTAK-UNDIP

11. King DJ. Applications and engineering of monoclonal antibodies. London: Taylor & Francis Ltd. 1998: 77-118.
12. Martin JE. Composite films for modifying evanescent wave characteristics in long-period grating biosensors (thesis). Virginia: Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001.
13. Byfield MP, Abuknesha RA. Biochemical aspects of biosensors. *Biosensor & Bioelectronics* 1994; 9: 373-400.
14. Herceptin[®]. Trastuzumab, anti-HER2 monoclonal antibody (monograph), 2nd ed. Jakarta: PT Roche Indonesia. 2003.
15. Wang NS. Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel: Experiment 7B. Department of Chemical Engineering. University of Maryland, USA, 2000.
16. Cancela MA, Álvarez E, Maceiras R. Polymers in alimentary industrie: properties of the sodium alginate. Department of Chemical Engineering, ETSEI. University of Vigo, Vigo, Spain, 2001.
17. Hyun AK, Moon SS, Ji WY. Preparation and characterization of hydrophobically modified alginate. *Polymer Bulletin*, 2002; 47: 429-35.
18. Hermes RS, Narayani R. Polymeric alginate films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 2002; 15: 54-6.
19. Cortner J. Essentials of molecular biology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Principles & practice of oncology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publisher, 1997: 3-33.
20. Benchimol S, Minden MD. Viruses, oncogenes, and tumor suppressor genes. In: Tannock IF, Hill RP, editors. *The basic science of oncology*, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co., 1998: 79-105.
21. Heimbrook DC, Oliff A, Gibbs JB. Essentials of signal transduction. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Principles & practice of oncology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publisher, 1997: 35-45.

22. Zanke BW. Growth factors and intracellular signaling. In: Tannock IF, Hill RP, editors. The basic science of oncology, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co., 1998: 106-33
23. Sklar JI, Costa JC. Principles of cancer management: molecular pathology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. Principles & practice of oncology, 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publisher, 1997: 259-84.
24. Stern DF. Tyrosine kinase signaling in breast cancer erbB family receptor tyrosine kinases. Breast Cancer Res 2000; 2: 176-83. [on line]: <http://www.breast-cancer-research.com/content/2/3/176>
25. Lacaci IM, Bianco C, De Santis M, Salomon DS. Epidermal growth factor-related peptides and their cognate receptors in breast cancer. In: Bowcock AM, editor. Breast cancer, molecular genetics, pathogenesis, and therapeutics, 1st ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1999: 31-57.
26. Baselga J, Hammond LA. HER-targeted tyrosine-kinase inhibitors. Oncology 2002; 63 (suppl 1): 6-16.
27. Goss PE, Tye LM. Hormones and cancer. In: Tannock IF, Hill RP, editors. The basic science of oncology, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co., 1998: 263-94.
28. Verma S. Overview of the 8th st.gallen international conference on primary therapy of early breast cancer, march 12-15, 2003 (meeting report). Current Oncology 2003; 10: 45-9.
29. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Waßmann K. C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. Breast Cancer Research 2003, 5: R30-6. [on line]: <http://www.breast-cancer-research.com/content/5/4/188>
30. Ullrich A. Molecular targets in cancer therapy and their impact on cancer management. Oncology 2002; 63 (suppl 1): 1-5.
31. Fan Z, Mendelsohn J. Breast cancer therapy using monoclonal antibodies against epidermal growth factor receptor and HER-2. In: Bowcock AM,

- editor. Breast cancer, molecular genetics, pathogenesis, and therapeutics, 1st ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1999: 419-36.
32. Spaner D, Radvanyi L, Miller RG. Immunology related to cancer. In: Tannock IF, Hill RP, editors. The basic science of oncology, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co., 1998: 240-62.
33. Bernstein NL. Biological therapy of cancer. In: Tannock IF, Hill RP, editors. The basic science of oncology, 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co., 1998: 420-42.
34. Bell R. What can we learn from herceptin[®] trials in metastatic breast cancer? *Oncology* 2002; 63 (suppl 1): 39-46.
35. Strachan T, Read AP. Physical mapping. Human molecular genetics. Oxford : BIOS Scientific Publisher Ltd, 1996: 11: 275-310.
36. Strachan T, Read AP. PCR-based DNA cloning and DNA analyses. Human molecular genetics. Oxford : BIOS Scientific Publisher Ltd, 1996 : 6 : 129-45.
37. Dedy H. Mengenal biosensor dan generasi terbaru biosensor. Tokyo: Zemi On Air, 2000: no 6-11.
38. Wong D, Gregorski KS, Hudson JS, Pavlath AE. Calcium alginates films: thermal properties and permeability to sorbate and ascorbate. Tektran Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture, 1998.
39. Mahardian M. Pengembangan biosensor berbasis enzim untuk mendeteksi kadar glukosa darah (skripsi). Bandung: Jurusan Fisika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Bandung, 2000.
40. Hanafiah KA. Rancangan percobaan. Teori dan aplikasi. Jakarta: Penerbit Rajawali Press, 1991: 67-78.
41. Welcome to the world of scanning electron microscopy. Iowa State University; Materials, Science & Engineering Department, 2004 [on line] : <http://mse.iastate.edu/microscopy/home.html>

42. JEOL-USA Scanning Electron Microscopes. JSM-6360LV. Peabody, USA, 2003 [on line] : <http://www.jeol.com/sem/semprods/jsm6360lv.html>
43. ESEM / EDAX System in description of some ESEM related terms. Bogaziçi University Advanced Technologies R&D Center Electron Microscopy and Microanalysis Unit. Bebek Istanbul, Turkey, 2004 [on line] : <http://www.arge.boun.edu.tr/ESEM/esehome2.html>
44. ESEM. Nanoworld. The University of Queensland, Australia, 2004 [on line] : <http://www.uq.edu.au/nanoworld/sem.html>