

**PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA HER2  
MENGUNAKAN SUSU SKIM DAN  
NORMAL SERUM**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat menyelesaikan  
Pendidikan Diploma IV Kesehatan  
Program Studi Analisis Kesehatan



Diajukan Oleh:  
Yulfa Ariza Masruro

G1C012019

**PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN  
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG**

**2016**

<http://lib.unimus.ac.id>

**PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA HER2  
MENGUNAKAN SUSU SKIM DAN  
NORMAL SERUM**

**SKRIPSI**

Diajukan sebagai salah satu syarat menyelesaikan  
Pendidikan Diploma IV Kesehatan  
Program Studi Analis Kesehatan



Diajukan Oleh:  
Yulfa Ariza Masruro

G1C012019




**PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN  
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG  
2016**

### Halaman Pengesahan

Skripsi ini telah diajukan pada sidang Ujian Jenjang Pendidikan Tinggi Diploma IV Kesehatan Program Studi Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang.

Tanggal Sidang: 5 September 2016

### Susunan Tim Penguji

No	Nama	Narasumber	Tanda Tangan	Tanggal Ttd
1.	Dr. Sri Darmawati, M. Si	Penguji I		23/9 2016
2.	Dra. Sri Sinto Dewi, M. Si. Med	Penguji II		23/9 2016
3.	Arya Iswara, M. Si. Med	Penguji III		23/09 2016

### Halaman Persetujuan

Skripsi dengan judul “Pengecatan Imunohistokimia HER2 Menggunakan Susu Skim dan Normal Serum” oleh Yulfa Ariza Masruro (NIM G1C012019)  
Diajukan sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan D IV Kesehatan Program Studi Analis Kesehatan.

Telah disetujui oleh:

Pembimbing I

Dra. Sri Sinto Dewi, M. Si. Med  
NIK. 28.6.1026.034

Tanggal, 23 Sept 2016 .....

Pembimbing II

Arya Iswara, M. Si. Med  
NIK. 28.6.1026.224

Tanggal, 23 Sept. 2016 .....

Mengetahui,

Ketua Program Studi D IV Analis Kesehatan  
Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan



Dra. Sri Sinto Dewi, M. Si. Med  
NIK. 28.6.1026.034

## PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA HER2 MENGGUNAKAN SUSU SKIM DAN NORMAL SERUM

Yulfa Ariza Masruro <sup>1</sup>, Sri Sinto Dewi <sup>2</sup>, Arya Iswara <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi D IV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

<sup>2,3</sup>Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

### ABSTRAK

HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) merupakan suatu reseptor pada permukaan sel yang berpengaruh pada proliferasi jaringan, mutasinya dapat menjadi onkogen. Over ekspresi dari HER2 pada kasus kanker dapat dilihat dengan teknik imunohistokimia (IHC). *Protein blocking* merupakan salah satu langkah dalam pengecatan IHC yang berfungsi menghalangi ikatan non spesifik pada jaringan dengan menggunakan normal serum dan *protein solution* (susu skim). Tujuan penelitian mengetahui gambaran hasil pengecatan IHC menggunakan normal serum dan susu skim. Penelitian secara eksperimental dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian jaringan kanker payudara HER2 positif dengan stadium +2 dari satu organ dan pasien yang sama. Pengecatan IHC menggunakan teknik *Strep(Avidin) Biotin Complex*. Pengecatan menggunakan *normal serum* didapatkan hasil +2, menggunakan susu skim 1% didapatkan hasil +3, sedangkan menggunakan susu skim 2% dan 3% didapatkan hasil +2. Terdapat perbedaan yang signifikan antara *normal serum* dengan susu skim 1%. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara *normal serum* dengan susu skim 2% dan susu skim 3%. Simpulan adalah *normal serum* dapat diganti dengan susu skim 2%.

Kata kunci: **HER2, normal serum, susu skim**

## IMMUNOHISTOCHEMISTRY STAINING OF HER2 USING NONFAT DRY MILK AND NORMAL SERUM

Yulfa Ariza Masruro<sup>1</sup>, Sri Sinto Dewi<sup>2</sup>, Arya Iswara<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of D IV Medical Laboratory Technology of Nursing and Health Science  
Faculty of Muhammadiyah University of Semarang

<sup>2,3</sup> Molecular Biology Laboratory of Nursing and Health Science Faculty of  
Muhammadiyah University of Semarang

### ABSTRACT

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) is a receptor on the cell surface that affect on the tissue proliferation, HER2's mutations can become the oncogenes. Over expression of HER2 in cancer cases can be seen in immunohistochemistry (IHC) technique. Protein blocking is the one of IHC-staining's step that blocks the non-specific binding on tissue using normal serum and protein solution (nonfat dry milk). Purpose of the research was to described the results of IHC staining using normal serum and nonfat dry milk. This research was experimental with cross-sectional approach. Sample of the research was HER2 positive on breast cancer tissue with stadium +2 of a same organ and patient. IHC-staining used *Strep(Avidin) Biotin Complex* technique. IHC-staining used normal serum obtained the result +2, used 1% nonfat dry milk obtained +3, while the 2% nonfat dry milk and 3% nonfat dry milk obtained the results of +2. There was significant difference between normal serum with 1% nonfat dry milk. There wasn't significant difference between normal serum with 2% nonfat dry milk and 3% nonfat dry milk. The conclusion is normal serum can be replaced with 2% nonfat dry milk.

Keywords: **HER2, normal serum, nonfat dry milk**

## HALAMAN PERNYATAAN ORIGINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa:

1. Skripsi ini asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana), baik di Universitas Muhammadiyah Semarang maupun di perguruan tinggi lain.
2. Skripsi ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri, tanpa bantuan pihak lain, kecuali arahan Tim Pembimbing dan masukan Tim Penguji.
3. Dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai sumber acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Semarang, September 2016  
Yang membuat pernyataan,



Yulfa Ariza Masturo  
NIM. G1C012019

## KATA PENGANTAR

Berkat nikmat pengetahuan dan kesehatan yang telah dilimpahkan oleh Allah swt. akhirnya penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian dalam bentuk skripsi yang berjudul “Pengecatan Imunohistokimia HER2 Menggunakan Susu Skim dan Normal Serum”.

Penyusunan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Diploma IV Analis Kesehatan di Universitas Muhammadiyah Semarang 2016.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah berperan dalam pembuatan skripsi ini, yaitu kepada yang terhormat:

1. Ketua Program Studi D IV Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang yang telah memberikan dorongan dan semangat untuk menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dra. Sri Sinto Dewi, M. Si. Med, selaku Pembimbing I yang telah dengan sabar memberikan petunjuk, dorongan, dan semangat terhadap penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Bapak Arya Iswara, M. Si. Med, selaku Pembimbing II yang telah memberikan petunjuk, dorongan, dan motivasi dengan jelas dan mudah dipahami dalam membimbing penulis pada penyusunan skripsi.



4. Bapak dan Ibu Dosen pengajar Program Studi D IV Analis Kesehatan pada khususnya dan Dosen Universitas Muhammadiyah Semarang pada umumnya atas ilmu yang telah diajarkan kepada penulis.
5. Keluarga dan teman-teman tercinta yang telah memberikan motivasi dan doa kepada penulis.
6. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat, baik sebagai sumber informasi maupun inspirasi bagi para pembaca.



Semarang, September 2016

Penyusun

Yulfa Ariza Masruro

G1C012019

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>Halaman Judul</b> .....	i
<b>Halaman Pengesahan</b> .....	ii
<b>Halaman Persetujuan</b> .....	iii
<b>Abstrak</b> .....	iv
<b>Surat Pernyataan Originalitas</b> .....	v
<b>Kata Pengantar</b> .....	vi
<b>Daftar Isi</b> .....	viii
<b>Daftar Tabel</b> .....	x
<b>Daftar Gambar</b> .....	xi
<b>Daftar Lampiran</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
1.4.1 Bagi Penulis .....	4
1.4.2 Bagi Instansi .....	4
1.4.3 Bagi Pembaca .....	4
1.5 Orisinalitas Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Karsinogenesis .....	7
2.2 HER2 .....	8
2.3 IHC .....	9
2.3.1 Tahapan Dasar IHC .....	9
2.3.1.1 Fiksasi dan Processing Jaringan .....	9
2.3.1.2 Antigen Retrieval .....	10
2.3.1.3 Endogenous Blocking .....	10
2.3.1.4 Protein Blocking .....	10
a. Normal Serum .....	11
b. Protein Solution .....	11
1.) Pengertian Susu Skim .....	11
2.) Penggantian Normal Serum dengan Susu Skim .....	12
c. Commercial Mixes .....	12
2.3.1.5 Inkubasi Antibodi .....	12
2.3.2 Metode Pengecatan IHC .....	13

2.3.2.1 Metode Langsung (Direct).....	13
a. Traditional Direct.....	13
b. New Direct (Enhanced Polymer One-Step Staining) .....	13
2.3.2.2 Metode Tidak Langsung (Indirect).....	14
a. Metode Immunogold Silver Staining (IGSS) .....	14
b. (Strept)avidin Biotin Complex .....	15
c. Metode Pelabelan Hapten .....	15
d. Metode Enzim-Antienzim .....	16
2.4 Kerangka Teori .....	17
2.5 Kerangka Konsep.....	17
2.6 Hipotesis .....	17
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Desain Penelitian .....	18
3.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	18
3.3 Variabel Penelitian.....	19
3.4 Definisi Operasional .....	19
3.5 Alat dan Bahan .....	20
3.6 Prosedur Penelitian .....	21
3.7 Alur Penelitian .....	23
3.8 Teknik Pengumpulan Data .....	23
3.9 Pengolahan dan Analisis Data .....	23
3.10 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Hasil.....	25
4.1.1 Hasil Pengamatan .....	25
4.1.2 Uji Statistik .....	26
4.2 Pembahasan .....	27
<b>BAB V SIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Simpulan.....	30
5.2 Saran .....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	31
<b>LAMPIRAN</b> .....	34

## DAFTAR TABEL

Nomor	Halaman
1. Orisinalitas penelitian.....	5
2. Interpretasi hasil pengecatan IHC HER2 .....	19
3. Hasil pengamatan pengecatan IHC berdasarkan ekspresi HER2 .....	26



## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Halaman
1. Proses menyeluruh dari metastasis sel kanker .....	7
2. Metode direct berlabel peroksidase (A) dan fluoresence (B).....	13
3. Metode strept(avidin) biotin complex .....	15
4. Metode pelabelan hapten.....	16
5. Metode enzim-antienzim.....	16
6. Kerangka teori penelitian .....	17
7. Kerangka konsep penelitian .....	17
8. Kanker payudara hasil negatif. Skor: 0 .....	20
9. Kanker payudara hasil lemah. Skor: +1 .....	20
10. Kanker payudara skor +2 .....	20
11. Kanker payudara skor +3 .....	20
12. Alur penelitian .....	23
13. Pengecatan IHC menggunakan normal serum (A), susu skim Indomilk® 1% (B), susu skim Indomilk® 2% (C), susu skim Indomilk® 3% (D), pada perbesaran 400x .....	25

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Halaman
1. Hasil uji Kruskal-Wallis .....	34
2. Hasil uji Post Hoc pada One Way Anova .....	35
3. Skema prosedur pengecatan IHC .....	36
4. Preparasi reagen .....	37
5. Dokumentasi pelaksanaan kegiatan.....	39



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pusat data dan informasi Kementerian Kesehatan RI tahun 2015 menyatakan bahwa kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia. Kematian yang disebabkan oleh kanker tercatat sekitar 8,2 juta pada tahun 2012. Sel kanker merupakan sel tubuh yang mengalami proliferasi tidak terkendali, yang dapat menyerang melampaui batas jaringan normal dan dapat bermetastasis ke jaringan atau organ tubuh lain melalui cairan limfe dan darah (Stratton et al, 2009).

Kanker dapat berkembang apabila gen-gen normal mengalami mutasi. Mutasi atau kerusakan pada DNA dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor penyebab mutasi DNA dapat berasal dari faktor lingkungan seperti radiasi, paparan bahan kimia di tempat kerja, dan virus (Kumar et al, 2010).

Manusia memiliki banyak gen, sehingga mutasi pada satu gen saja tidak akan menimbulkan terjadinya kanker, kecuali apabila mutasi terjadi pada gen-gen tertentu yang dapat menimbulkan terjadinya kanker. Salah satu gen yang dapat menimbulkan kanker adalah onkogen. Onkogen merupakan bentuk mutan dari protoonkogen, di mana protoonkogen itu sendiri berperan dalam pertumbuhan dan pembelahan sel-sel normal (Wulandari, 2008). Mekanisme fisiologi proses pembelahan sel normal akan mengalami gangguan apabila protoonkogen mengalami mutasi menjadi onkogen (Tjandra, 2010).

Kebanyakan kasus kanker ditemukan karena adanya mutasi dan ekspresi hasil metabolisme patologik yang berlebihan (over ekspresi) dari bentuk normal reseptor faktor pertumbuhan. Over ekspresi hasil metabolisme yang dihasilkan akan menimbulkan proliferasi jaringan di sekitarnya. Over ekspresi dari reseptor faktor pertumbuhan yang dapat ditemukan pada kasus kanker adalah HER2 (Kumar et al, 2005). HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) merupakan suatu reseptor pada permukaan sel yang berpengaruh pada proses proliferasi sel pada jaringan (Coussen, 2005). Over ekspresi HER2 sangat erat kaitannya dengan kasus kanker sehingga HER2 dapat digunakan sebagai diagnosis penyakit kanker.

Ekspresi HER2 pada kasus kanker dapat dilihat dengan suatu penanda biologi atau biomarker. *American Society of Clinical Oncology/Collage of American Pathologis* (ASCO/CAP) telah menetapkan bahwa teknik yang dapat digunakan untuk pemeriksaan biomarker secara valid adalah *immunohistochemistry* (IHC) dan *fluorescence in situ hybridization* (FISH) (Park et al, 2014). Pemeriksaan IHC jauh lebih murah apabila dibandingkan dengan FISH sehingga pemeriksaan tersebut lebih banyak diaplikasikan di beberapa laboratorium Patologi Anatomi di Indonesia untuk pemeriksaan kanker. IHC merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menetapkan dan mengidentifikasi jenis protein tersebut dalam sel-sel jaringan dengan memanfaatkan prinsip pengikatan antigen-antibodi (Hastuti dan Lubis, 2011). Pemeriksaan IHC awalnya hanya digunakan untuk penelitian, tetapi sekarang telah banyak digunakan dalam dunia kedokteran untuk



menentukan diagnosis penyakit dan sangat relevan untuk menilai terapi dari biomarker (Walker, 2006).

Pengecatan IHC merupakan serangkaian proses manual tapi kompleks yang terdiri dari beberapa langkah sehingga biasanya pemeriksaan tersebut hanya dilakukan oleh pekerja yang ahli dan memiliki fokus yang tinggi (Prichard, 2014). Kesalahan-kesalahan yang terjadi selama proses pengecatan IHC dapat menimbulkan *trouble shooting* yang dapat memengaruhi hasil pemeriksaan, salah satunya adalah buruknya intensitas *background staining*. Intensitas *background staining* yang buruk dapat disebabkan oleh tidak cukupnya *blocking agent* yang digunakan. *Blocking agent* yang dapat digunakan untuk *protein blocking* pada pengecatan IHC diantaranya adalah *normal serum*, *protein solution*, dan *commercial mixes*. *Blocking agent* yang digunakan pada proses *protein blocking* belum ada yang dipatenkan sehingga dapat digunakan salah satu dari ketiganya.

*Normal serum* hingga saat ini masih sering digunakan untuk *protein blocking* karena *normal serum* tidak dapat terlibat dalam reaksi imunologi (Dabbs, 2014), tetapi dalam penggunaannya sehari-hari normal serum memiliki kekurangan, yaitu harganya relatif mahal dan susah didapat sehingga diperlukan *blocking agent* yang lebih mudah didapat dan harganya relatif lebih murah yaitu *protein solution*, seperti *nonfat dry milk* (susu skim).

Berdasarkan uraian di atas, penulis bermaksud mengangkat judul “Pengecatan Imunohistokimia HER2 Menggunakan Susu Skim dan Normal Serum” sebagai bahan penelitian.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut, dapat dibuat rumusan masalahnya yaitu “Bagaimanakah gambaran dari hasil pengecatan imunohistokimia HER2 menggunakan susu skim dan *normal serum*?”

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran hasil pengecatan imunohistokimia HER2 menggunakan *normal serum* dan susu skim.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Bagi Penulis

Sebagai penambah ilmu pengetahuan mengenai prosedur pengecatan imunohistokimia HER2, khususnya proses *protein blocking* menggunakan susu skim serta hasil pengecatan yang didapat dari proses tersebut.

### 1.4.2 Bagi Instansi

Sebagai informasi dan bahan masukan mengenai hasil pengecatan imunohistokimia HER2 terutama mengenai *blocking agent* yang dapat digunakan untuk proses *protein blocking*.

### 1.4.3 Bagi Pembaca

Sebagai bahan referensi dan kepustakaan mengenai imunohistokimia.

## 1.5 Orisinalitas Penelitian

Tabel 1. Orisinalitas penelitian

NO	Nama, Tahun	Judul	Hasil
1.	Yamashita-Kashima et al, 2014	Importance of Formalin Fixing Condition for HER2 Testing in Gastric Cancer: Immunohistochemical Staining and Fluorescence In Situ Hybridization	Spesimen yang dibiarkan selama 6-24 jam sebelum difiksasi dapat menyebabkan penyusutan sel dan menurunkan intensitas pewarnaan. Intensitas pewarnaan yang dihasilkan saat fiksasi menggunakan 20% NBF, 10% nonbuffered formalin, dan 20% nonbuffered formalin lebih buruk daripada fiksasi dengan 10% NBF. Pada spesimen SCH dan SNU-16, spesimen yang difiksasi selama 24 jam akan mengalami autolisis dan setelah 10 hari dapat menurunkan skor HER2. Lamanya waktu fiksasi tidak mempengaruhi hasil FISH, tetapi jika dibiarkan lebih dari 6 jam sebelum difiksasi, dapat menurunkan skor HER2 pada spesimen SCH.
2.	Yaldiz-Aktas et al, 2012	The Effect of Cold Ischemic Time on The Immunohistochemical Evaluation of Esterogen Receptor, Progesteron Receptor, and HER2 Expression in Invasive Breast Carcinoma	Jangka waktu <i>cold ischemic</i> sekitar 1,5 jam dapat mempengaruhi pewarnaan IHC untuk progesteron. Penurunan yang signifikan juga terjadi pada reseptor hormon dan HER2 tetapi tidak sampai 4 jam untuk sampel yang didinginkan dan 2 jam untuk sampel yang tidak didinginkan (suhu ruang).

Perbedaan antara penelitian yang penulis lakukan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yamashita-Kashima et al. dan Yaldiz-Aktas et al. terletak pada modifikasi yang dilakukan. Penelitian Yamashita-Kashima et al. melakukan modifikasi dengan meneliti pengaruh dari penundaan fiksasi, lamanya waktu fiksasi, dan reagen fiksasi yang digunakan terhadap intensitas pewarnaan IHC dan skor atau nilai ekspresi HER2. Penelitian yang dilakukan Yaldiz-Akita et al.

meneliti tentang periode atau jangka waktu *cold ischemic* terhadap ekspresi ER, PR, dan HER2, sedangkan penelitian penulis melakukan modifikasi pada proses *protein blocking* menggunakan susu skim, selanjutnya penulis melihat intensitas pewarnaan yang dihasilkan terhadap ekspresi HER2.

Perbedaan lain terletak pada penelitian yang dilakukan oleh Yamashita-Kashima et al. yang menggunakan tiga spesimen tumor yaitu NCI-N87, SCH, dan SNU-16 untuk dilihat ekspresi HER2 nya, sedangkan penelitian penulis hanya menggunakan satu macam spesimen tumor saja.

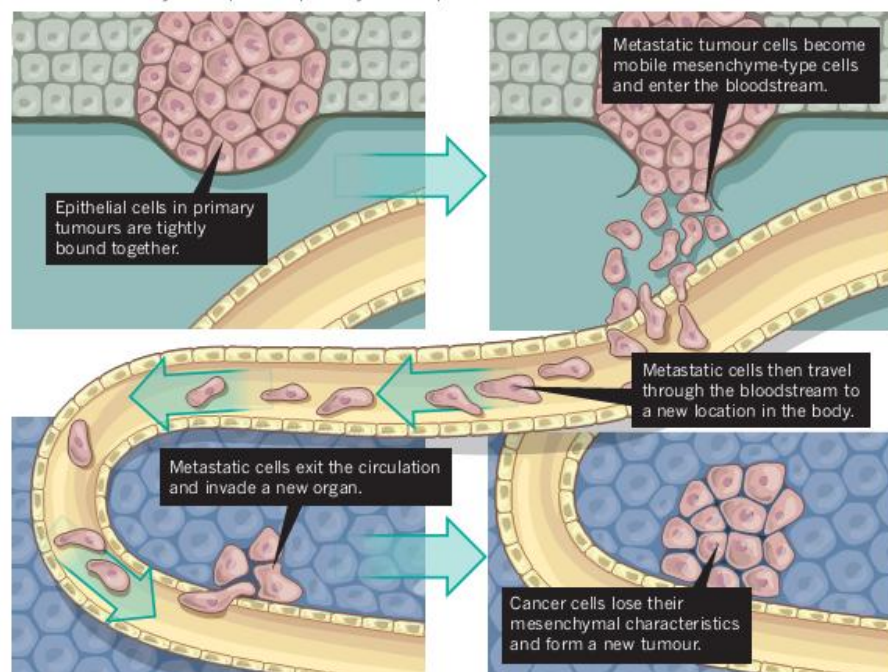


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Karsinogenesis

Kementrian Kesehatan RI tahun 2015 menyatakan bahwa karsinogenesis merupakan proses terjadinya kanker yang disebabkan oleh pertumbuhan tidak normal dari sel jaringan tubuh. Kebanyakan kanker berasal dari sel epitel yang melapisi organ, yang kemudian disebut dengan *carcinoma*. Sel epitel pada keadaan normal sebenarnya tidak bergerak, tetapi selama masa perkembangan embrionik beberapa dari sel epitel kanker mulai memproduksi protein yang dapat meningkatkan motilitas dan mengurangi perekatan sel (Ledford, 2011).



Gambar 1. Proses menyeluruh dari metastasis sel kanker (Ledford, 2011)

Proses karsinogenesis memiliki dua prinsip. Pertama adalah adanya kerusakan pada genetik. Kedua, adanya gangguan pada empat kelompok gen pengatur regulasi normal yaitu gen yang merangsang pertumbuhan protoonkogen, penghambatan tumor supresor gen, regulasi terhadap apoptosis, dan gen yang terlibat dalam DNA repair (Kumar et al, 2010).

Protoonkogen akan memicu pembelahan sel dari berbagai jalur, di mana banyak dari protoonkogen ini akan memproduksi hormon sebagai mediator kimia di antara sel yang akan mendorong terjadinya mitosis. Mutasi dari protoonkogen dapat mengubah ekspresi dan fungsinya serta meningkatkan jumlah dan aktivitas protein yang dihasilkan. Protoonkogen akan berubah menjadi onkogen ketika mengalami mutasi dan hal tersebut akan berpotensi menyebabkan sel untuk membelah secara luas dan tidak terkontrol (Vlahopoulos et al, 2008).

## **2.2 HER2**

HER2 yang disebut juga dengan HER2/neu, ErbB 2 atau c-ErbB 2, memiliki peranan penting dalam karsinogenesis, yaitu suatu proses perubahan sel normal menjadi sel kanker (Mayr et al, 2006). HER2 merupakan salah satu kelompok ErbB reseptor yang berasal dari kelompok subkelas dari superfamili reseptor tirosin kinase (RTKs) (Citri dan Yarden, 2006).

Suatu fakta mengenai pentingnya HER2 pada kanker telah ditemukan pada awal tahun 1980 dengan menggunakan hewan coba sehingga memunculkan hipotesis tentang over ekspresi onkogen HER2 pada beberapa karsinogenesis kanker manusia (Moasser, 2007). Protein HER2 itu sendiri pada awalnya

merupakan gen normal yang berfungsi untuk pertumbuhan. Amplifikasi pada HER2 akan menjadi onkogen dan berujung kanker, terutama kanker payudara, ovarium, gaster, kepala leher, dan kolorektal (Stricker dan Kumar, 2010 ; Tai et al, 2010 ; Afriani et al, 2015).

*American Society of Clinical Oncology (ASCO)* dan *College of American Pathologist (CAP)* pada tahun 2007 telah merekomendasikan suatu pengujian HER2 untuk mengurangi kesalahan dalam pemeriksaan (Wolff et al, 2007). Pengujian HER2 saat ini dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu IHC, FISH, *chromogenic in situ hybridization (CISH)*, dan *silver-enhanced in situ hybridization (SISH)* (Shi et al, 2009).

## 2.3 IHC

IHC merupakan sebuah teknik untuk mengidentifikasi unsur-unsur (antigen) yang terdapat dalam sel atau jaringan dengan memanfaatkan interaksi antara antigen dan antibodi, di mana bagian dari antibodi akan mengidentifikasi baik pelabelan langsung pada antibodi maupun menggunakan metode pelabelan antibodi sekunder (Bancroft dan Gamble, 2008).

### 2.3.1 Tahapan Dasar IHC

Protokol umum pengecatan IHC terdiri dari beberapa langkah atau tahapan dasar, yaitu:

#### 3.3.1.1 Fiksasi dan Processing Jaringan

Pada pengecatan IHC, cairan fiksasi yang umum digunakan adalah buffer formalin 10% dalam suasana netral selama 24-72 jam. *Processing* jaringan itu

sendiri terdiri dari fiksasi, dehidrasi, dan *embedding* (penanaman) jaringan pada blok parafin agar jaringan menjadi kaku (Dabbs, 2013).

### 3.3.1.2 Antigen Retrieval

Proses antigen retrieval bertujuan untuk mengembalikan struktur protein atau antigen yang rusak pada saat proses fiksasi. Proses ini dapat dilakukan dengan cara enzimatik, *heat induced epitope retrieval* (HIER), maupun campuran keduanya (Dabbs, 2013). Beberapa larutan yang digunakan dalam proses antigen retrieval adalah sodium citrat, EDTA, Tris, urea, sukrosa, dan larutan komersial yang disediakan oleh kit (Platero, 2009)

### 3.3.1.3 Endogenous Blocking

Proses *endogenous blocking* merupakan sesuatu yang sangat penting. Tingkat kerentanan dari enzim untuk mengalami denaturasi dan inaktivasi selama proses fiksasi sangat bervariasi. Beberapa enzim seperti peroksidase yang terdapat pada *paraffin section* dan *frozen section* tidak akan mengalami denaturasi saat proses fiksasi sehingga diperlukan proses *endogenous blocking* untuk menghindari terjadinya *false positive* (positif palsu). Larutan yang biasa digunakan untuk *endogenous blocking* adalah  $H_2O_2$  (Dabbs, 2013).

### 3.3.1.4 Protein Blocking

*Protein blocking* diterapkan sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan pada pengecatan IHC. Prinsip dari proses *protein blocking* menurut Latja (2007) adalah larutan protein (*blocking agent*) yang ditambahkan akan mengikat protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibodi.



Cara yang paling efektif untuk meminimalisasi pewarnaan nonspesifik adalah dengan menambahkan larutan protein (Bancroft dan Gamble, 2008). Proses *protein blocking* pada prosedur umum pengecatan IHC dapat dilakukan dengan menginkubasi preparat selama 30-60 menit pada suhu kamar (20-25°C) atau 4°C menggunakan *blocking agent* (Latja, 2007). Beberapa *blocking agent* untuk *protein blocking* menurut Radig (2013), yaitu:

#### **a. Normal Serum**

*Normal serum* dapat dikatakan sebagai *blocking agent* yang baik dalam proses *protein blocking*, tetapi harga dari *normal serum* relatif lebih mahal dibandingkan dengan *blocking agent* yang lain. *Normal serum* yang digunakan harus berasal dari spesies yang sama dengan antibodi sekunder. *Normal serum* yang mengandung antibodi akan berikatan dengan epitop nonspesifik pada jaringan sehingga menghalangi ikatan nonspesifik yang mungkin dapat terjadi.

#### **b. Protein Solution**

Penggunaan *protein solution* pada metode ini teorinya adalah antibodi tidak dapat mengikat epitop nonspesifik sebaik *protein solution*. Metode ini jauh lebih ekonomis dan dapat bekerja baik pada antibodi monoklonal. *Protein solution* yang biasanya digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) 0,1-0,5%, gelatin, dan susu skim.

##### **1.) Pengertian Susu Skim**

Susu skim merupakan produk susu yang telah dihilangkan kandungan lemaknya dan dipasteurisasi atau disterilisasi dengan proses UHT (*Ultra High Temperature*) (Utami, 2009). Produk susu tersebut dibuat dengan cara

menghilangkan kandungan air dan lemak tanpa harus menghilangkan kandungan gizi lain yang terdapat dalam susu, seperti laktosa, protein, mineral, dan vitamin. Susu skim mengandung protein sebesar 37,4% dan lemak sebesar 0,5% (Suryaningsih et al, 2015 ; Ginting dan Pasaribu, 2005).

## **2.)Penggantian Normal Serum dengan Susu Skim**

Penggunaan susu skim sebagai pengganti *normal serum* dalam proses *protein blocking* IHC dikarenakan mempertimbangkan hal-hal berikut:

- a) Lebih mudah didapat dan harganya relatif lebih murah.
- b) Susu skim lebih unggul dalam menanggulangi pewarnaan inti sel ginjal pada pengecatan imunofluoresens (Duhamel dan Johnson, 1985).
- c) Susu skim lebih efektif untuk menghalangi ikatan nonspesifik dari HRP-conjugated Ab sekunder pada pemeriksaan ELISA apabila dibandingkan dengan *blocking agent* yang lain (Vogt et al, 1987).

### **c. Commercial Mixes**

*Commercial blocking agent* yang terdapat di pasaran sangat beragam. *Blocking agent* tersebut biasanya terbuat dari protein tunggal yang terkonsentrasi atau protein bebas senyawa.

#### **3.3.1.5 Inkubasi dengan Antibodi**

Antibodi merupakan suatu molekul yang dapat bergabung atau berikatan dengan molekul kedua, yang disebut dengan antigen. Antibodi ini nantinya akan berikatan secara spesifik dengan antigen atau protein yang terdapat dalam jaringan. Antibodi yang digunakan dalam pengecatan IHC diproduksi dari hewan yang diinduksi secara khusus dengan antigen tertentu untuk menciptakan atau

memunculkan respon imun. Antibodi yang digunakan untuk menginkubasi dapat menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal (Dabbs, 2013).

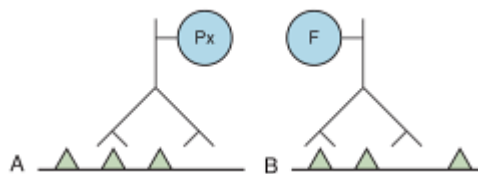
### 2.3.2 Metode Pengecatan IHC

Metode atau sistem deteksi dalam pengecatan IHC yang dapat digunakan untuk melokalisasi dan menampilkan antigen dalam jaringan (Bancroft dan Gamble, 2008) yaitu:

#### 2.3.2.1 Metode langsung (*Direct*)

##### a. Traditional Direct

Metode pengecatan imunohistokimia secara langsung (*direct*) cara tradisional merupakan metode dengan menggunakan satu macam antibodi saja, yaitu antibodi primer yang telah berlabel akan bereaksi langsung dengan antigen pada preparat sitologi maupun histologi untuk mengenali antigen spesifiknya (Howard dan Kaser, 2014 ; Bancroft dan Gamble, 2008). Metode ini cepat dan mudah untuk dilakukan dalam mendeteksi antigen, tetapi memiliki tingkat sensitivitas yang rendah (Howard dan Kaser, 2014).



Gambar 2. Metode *direct* berlabel peroksidase (A) dan fluorecence (B) (Taylor dan Cote, 2006)

##### b. New Direct (Enhanced Polymer One-step Staining)

Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Pluzek et al pada 1993. Banyaknya molekul antibodi primer dan enzim peroksidase yang dilekatkan pada

*backbone* polimer dekstran akan meningkatkan sinyal amplifikasi dan memberikan tingkat sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan teknik *traditional direct*. Kekurangan dari teknik ini adalah keterbatasan dari jumlah antibodi primer yang tersedia sehingga teknik EPOS (*Enhanced Polymer One-step Staining*) sangat jarang digunakan dalam pengecatan IHC (Bancroft dan Gamble, 2008).

### **2.3.2.2 Metode Tidak Langsung (Indirect)**

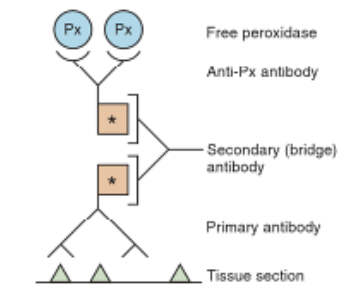
Antibodi primer yang digunakan pada pengecatan IHC metode *indirect* tidak berlabel. Metode ini terdapat dua atau lebih lapisan dari reagen yang digunakan, di mana lapisan terakhirlah yang diberi label. Metode *indirect* lebih rumit dan lama pengerjaannya apabila dibandingkan dengan metode *direct* (Howard dan Kaser, 2014). Kelebihan dari metode *indirect* adalah memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi yaitu beberapa ribu kali lebih sensitif daripada metode *direct* sehingga metode *indirect* saat ini lebih banyak digunakan dalam pemeriksaan IHC (Howard dan Kaser 2014).

#### **a. Metode Immunogold Silver Staining (IGSS)**

Metode deteksi antigen ini diperkenalkan oleh Faulk dan Tayler pada 1971, yang menggunakan koloid emas sebagai label. Partikel emas ditingkatkan dengan penambahan lapisan logam perak untuk menghasilkan partikel logam perak yang melapisi marker koloid emas sehingga dapat dilihat dalam mikroskop cahaya. Tingkat kesensitivitasan teknik ini lebih tinggi dibandingkan dengan teknik PAP (Peroxidase-Antiperoxidase), tetapi menghasilkan *background* yang buruk (Bancroft dan Gamble, 2008).



diciptakan menggunakan antibodi anti-hapten dengan hapten berlabel enzim peroksidase maupun hapten berlabel PAP (Bancroft dan Gamble, 2008).

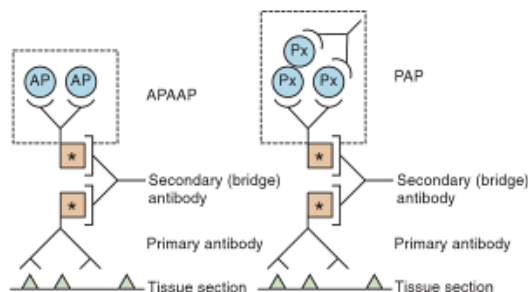


Gambar 4. Metode pelabelan hapten (Taylor dan Cote, 2006)

#### d. Metode Enzim-Antienzim

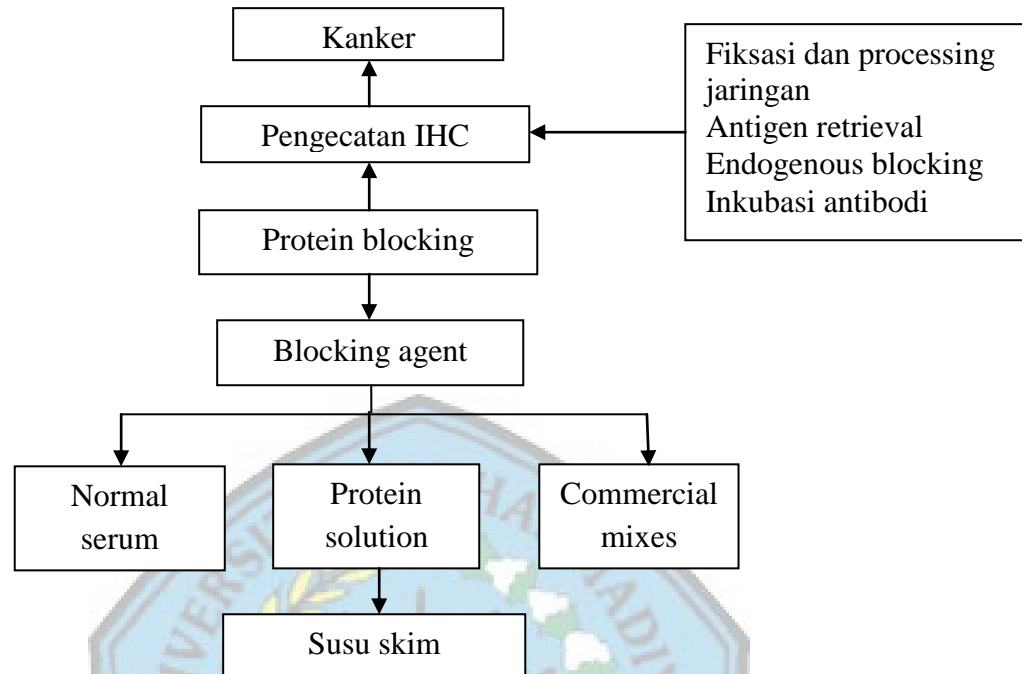
Metode enzim-antienzim dapat digunakan dua bentuk, yaitu metode peroksidase-antiperoksidase (PAP) dan alkali phosphatase-antialkali phosphatase (APAAP). Metode PAP pertama kali digunakan oleh Sternberger et al untuk mendeteksi antibodi Treponema. Prinsip dari pemeriksaan ini hampir sama dengan metode pelabelan hapten (Dabbs, 2013).

Metode APAAP hampir mirip dengan PAP, hanya enzim yang digunakannya yang berbeda. Metode APAAP saat ini tidak banyak digunakan karena reagen yang digunakan tidak selalu tersedia (Dabbs, 2013).



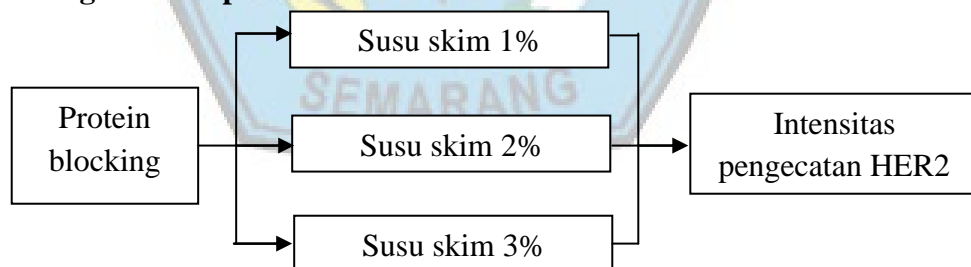
Gambar 5. Metode enzim-antienzim (Taylor dan Cote, 2006)

## 2.4 Kerangka Teori



Gambar 6. Kerangka teori penelitian

## 2.5 Kerangka Konsep



Gambar 7. Kerangka konsep penelitian

## 2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak terdapat perbedaan intensitas HER2 yang dihasilkan dari pengecatan IHC baik menggunakan susu skim maupun *normal serum*.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *cross sectional* (potong lintang).

#### **3.2 Populasi dan Sampel Penelitian**

Populasi dari penelitian ini adalah semua jaringan payudara yang terdapat di Rumah Sakit Elisabeth Semarang. Sampel dari penelitian ini adalah jaringan kanker payudara yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Adapun kriteria inklusinya adalah:

- a. Jaringan payudara HER2 positif dengan stadium kanker 2+.
- b. Blok parafin masih ada dan dalam kondisi baik untuk dilakukan pemeriksaan IHC.

Adapun kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah

- a. Preparat jaringan yang digunakan tidak berasal dari satu pasien dan organ yang sama.
- b. Blok parafin sudah rusak dan tidak dapat digunakan.



### 3.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang akan diamati adalah ekspresi HER2 dari jaringan kanker payudara dengan pengecatan IHC menggunakan *normal serum* dan susu skim merek Indomilk® dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%..

### 3.4 Definisi Operasional

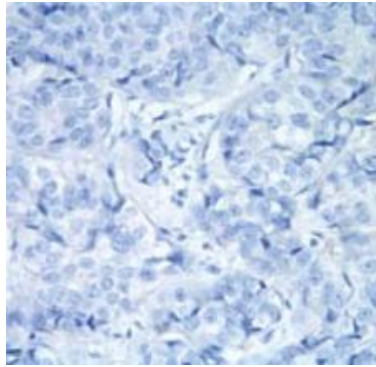
*Protein blocking* merupakan salah satu langkah dalam prosedur IHC, di mana fungsinya adalah menghalangi ikatan nonspesifik pada jaringan agar tidak terjadi positif palsu.

Penggunaan susu skim dan *normal serum* dalam pengecatan imunohistokimia berarti menggunakan susu skim Indomilk® 1%, 2%, 3%, dan *normal serum* sebagai *blocking agent* pada proses *protein blocking* dalam pengecatan IHC HER2.

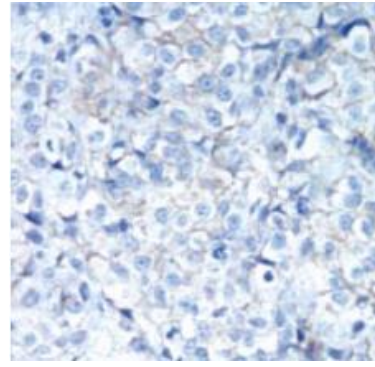
Ekspresi HER2 merupakan penilaian protein HER2 melalui pengecatan IHC metode *Strep(Avidin) Biotin Complex* menggunakan antibodi primer c-erbB-2/HER2 dari Biocare medical. Hasil pengecatan dilihat intensitasnya yang diberi skor 0, 1+, 2+, dan 3+ dengan kriteria penilaian yang mengacu pada *ASCO/CAP HER2 Test Guidelines Recommendation 2013*.

Tabel 2. Interpretasi hasil pengecatan IHC HER2

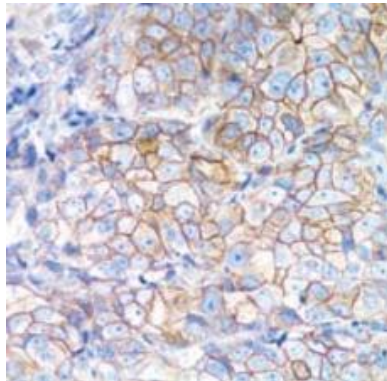
Skor	Penilaian
0	Intensitas pewarnaan pada membran nyaris tidak terlihat dari sel yang terwarnai.
1+	Intensitas pewarnaan pada membran terlihat samar.
2+	Intensitas pewarnaan pada membran tampak tidak menyeluruh (utuh) atau bersifat lemah atau sedang.
3+	Intensitas pewarnaan pada membran tampak menyeluruh (utuh) atau bersifat kuat.



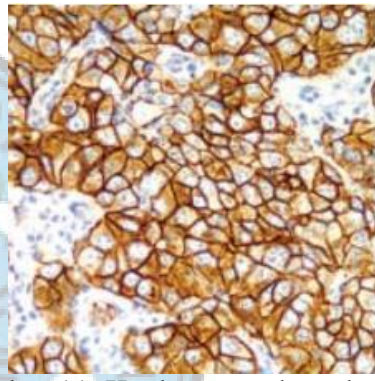
Gambar 8. Kanker payudara hasil negatif. Skor 0 (40x) (Gown, 2008)



Gambar 9. Kanker payudara hasil lemah. Skor: +1 (40x) (Gown, 2008)



Gambar 10. Kanker payudara skor +2 (40x) (Gown, 2008)



Gambar 11. Kanker payudara skor: +3 (40x) (Gown, 2008)

### 3.5 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet, mikropipet, microwave, staining jar, oven, bekker glass, oven, object glass, deck glass, gelas ukur, dan neraca analitik.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah entelan, xylol, alkohol (absolut, 96%, 70%), aquades, buffer sitrat, larutan PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *blocking agent* (susu skim dan *normal serum/background sniper*), antibodi primer monoklonal c-erbB-2/HER2 Biocare medical, antibodi sekunder (*Trekkie Universal Link*), *Trekk avidin HRP*, kromogen DAB, dan hematoxylin.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur pengecatan IHC yang dilakukan mengacu pada kit *Intruction Manual Star Trek Universal Immunoperoxidase Detection System*. Sediaan jaringan yang telah dipotong dari blok parafin dengan ketebalan 3 – 4 mikron dimasukkan ke dalam oven selama 1 – 2 jam pada suhu 37°C dan 30 menit pada suhu 60°C. Deparafinisasi dengan xylol selama 3 menit sebanyak 3 kali, kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat (absolut, 96%, 70%) masing-masing selama 3 menit. Sediaan jaringan direndam dengan aquades selama 3 menit dan dilakukan proses *endogenous blocking* menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dalam metanol selama 5 menit.

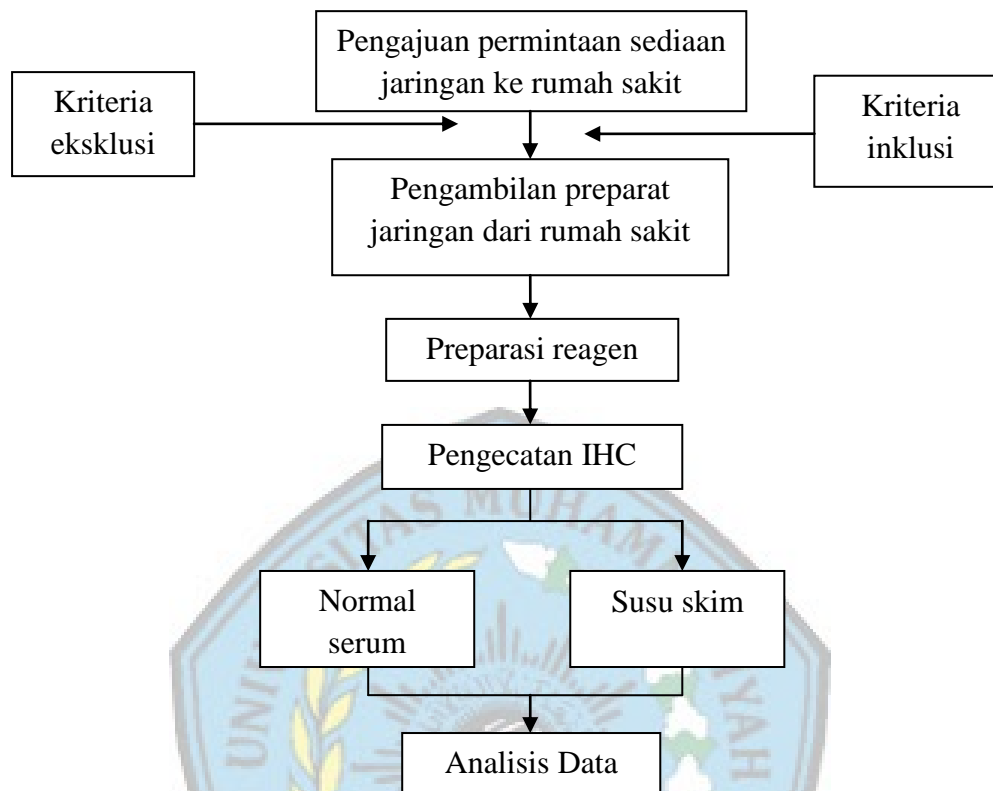
Sediaan dicuci dengan air mengalir selama 3 menit dan direndam dalam aquades selama 3 menit pula. Proses antigen retrieval dilakukan dengan memasukkan sediaan ke dalam buffer sitrat dan dipanaskan dalam *microwave* suhu 600°C selama ± 5 menit dan dilanjutkan suhu 450°C selama 5 menit, kemudian dilakukan pendinginan secara bertahap. Sediaan jaringan dibiarkan dahulu di dalam *microwave* sampai hangat, lalu dikeluarkan dari *microwave* tanpa membuka tutup *staining jar*. *Staining jar* diangkat dari bekker glass setelah tidak terlalu panas dan dibiarkan sampai dingin lalu tutup *staining jar* dibuka. Sediaan jaringan diangkat dan dicuci dengan PBS (pH 7,2) sebanyak 2 kali masing-masing 3 menit.

Air yang terdapat di sekitar jaringan dilap menggunakan tisu. Setelah itu *blocking* terhadap ikatan non spesifik dilakukan menggunakan *blocking agent* selama 15 menit pada suhu ruang, lalu air yang terdapat di sekitar jaringan dilap

kembali dengan tisu. Langkah selanjutnya adalah dilakukan inkubasi antibodi primer selama minimal 1 jam dan maksimal semalam pada suhu ruang (dalam keadaan lembab) dengan antibodi primer *rabbit IgG monoclonal biocare medical c-erbB-2/HER-2 #cat CME 342 A* pengenceran 1:100 (Yildirim et al, 2012). Sediaan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali masing-masing 3 menit dan dilap dengan tisu, kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Trekkie universal link*) selama 20 menit. Pencucian kembali dilakukan dengan PBS sebanyak 2 kali dengan masing-masing pencucian selama 3 menit, lalu diinkubasi dengan *Trek avidin HRP* selama 10 menit. Sediaan kembali dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali dengan masing-masing selama 3 menit, lalu diinkubasi dengan DAB kromogen selama 3 – 5 menit pada tempat gelap. Sediaan direndam dalam aquades I dan II selama masing-masing 10 menit.

*Counterstain* dilakukan dengan menggenangi sediaan menggunakan hematoxylin selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Sediaan jaringan direndam dalam PBS (pH 7,2 – 7,6) selama 3 menit dan alkohol 70%, 96% serta alkohol absolut masing-masing selama 3 menit. Sediaan jaringan dilakukan *clearing* menggunakan xylol III, II, dan I selama 3 menit, lalu dilakukan *mounting* dengan entelan untuk diperiksa.

### 3.7 Alur Penelitian



Gambar 12. Alur penelitian

### 3.8 Teknik Pengumpulan Data

Pembacaan hasil pengecatan IHC HER2 pada mikroskop dengan perbesaran 400x sebanyak 100 sel. Intensitas yang didapat selanjutnya dicocokkan dengan *ASCO/CAP HER2 Test Guidelines Recommendation 2013* sehingga menghasilkan suatu data. Data yang didapat selanjutnya dikumpulkan dan dicatat.

### 3.9 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis data merupakan bagian yang sangat penting dalam penelitian, karena dengan adanya analisis data hipotesis yang ditetapkan dapat diuji kebenarannya untuk selanjutnya dapat diambil suatu kesimpulan. Analisis data pada penelitian

ini menggunakan analisis statistik dengan menggunakan program statistik komputer uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey*.

### **3.10 Tempat dan Waktu Pelaksanaan**

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Elisabeth Semarang dan laboratorium Biologi Molekuler Universitas Muhammadiyah Semarang pada Februari-April 2016.



## BAB IV

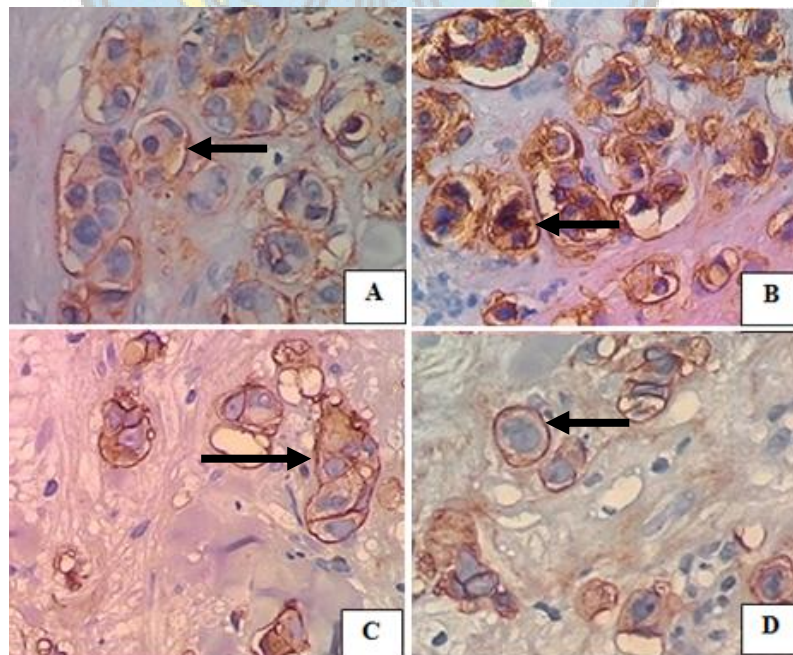
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Hasil

Penelitian tentang pengecatan IHC menggunakan *normal serum* atau *background sniper* dan susu skim Indomilk® 1%, 2%, dan 3% dilakukan terhadap 3 sediaan untuk masing-masing perlakuan, yang berasal dari organ payudara dari satu pasien kanker dengan HER2 positif. Blok parafin dari jaringan kanker payudara HER2 positif dipotong menggunakan mikrotom menjadi 12 sediaan untuk 4 perlakuan berbeda, masing-masing 3 sediaan untuk setiap perlakuan.

##### 4.1.1 Hasil Pengamatan

Hasil pengamatan dari pengecatan IHC dengan *normal serum* dan susu skim 1%, 2%, dan 3% dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 13. Pengecatan IHC menggunakan *normal serum* (A), susu skim 1% (B), susu skim 2% (C), susu skim 3% (D) pada perbesaran 400x.

Keterangan tanda panah: ekspresi HER2 pada membran sel

Ekspresi HER2 tampak pada bagian membran sel, yang akan dinilai berdasarkan intensitasnya, yaitu kuat-lemahnya penyerapan cat. Distribusi ekspresi HER2 berdasarkan intensitasnya terhadap tiga sediaan dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 3. Hasil pengamatan pengecatan IHC berdasarkan ekspresi HER2

Blocking Agent	Penilaian ekspresi HER2		
	1	2	3
Normal serum	2+	2+	2+
Susu skim 1%	3+	3+	3+
Susu skim 2%	2+	2+	2+
Susu skim 3%	2+	2+	2+

#### 4.1.2 Uji Statistik

Data yang didapat dari penelitian merupakan data yang memiliki skala data ordinal sehingga pengujian dilakukan menggunakan analisis *Kruskal-Wallis* untuk menguji ada-tidaknya perbedaan dari 4 kelompok perlakuan. Pengujian tersebut mendapatkan nilai signifikansi sebesar 0,012 atau lebih kecil dari 0,05 (lampiran 1).

Data selanjutnya dianalisis lanjutan menggunakan uji *Post Hoc Tukey* setelah didapatkan adanya perbedaan ( $H_0$  ditolak), untuk menguji perbedaan dari masing-masing perlakuan. Uji *Post Hoc Tukey* yang telah dilakukan menunjukkan bahwa perbandingan antara *normal serum* dengan susu skim Indomilk® 1% memiliki nilai signifikansi 0,000 yang berada dibawah taraf signifikansi (0,05) sehingga dinyatakan bahwa  $H_0$  ditolak (terdapat perbedaan). Perbandingan antara *normal serum* dengan susu skim 2% memiliki nilai signifikansi 1,000 > 0,05, maka  $H_0$  diterima. Perbandingan antara *normal serum* dengan susu skim



Indomilk® 3% memiliki nilai signifikansi  $0,998 > 0,05$ , maka  $H_0$  diterima (lampiran 2).

#### 4.2 Pembahasan

Penyebab *non-specific background staining* pada pengecatan IHC adalah adanya ikatan hidrofobik dan ionik. Ikatan hidrofobik merupakan ikatan yang dihasilkan dari *cross-linking* asam amino antarmolekul protein yang saling berdekatan. *Cross-linking* ini dihasilkan dari fiksasi jaringan menggunakan aldehid (Bancroft dan Gamble, 2008). Ikatan hidrofobik dapat dihilangkan atau dikurangi dengan penambahan protein, penambahan detergent seperti Triton X (Hartman, 1973), atau penambahan larutan garam dengan konsentrasi yang tinggi yaitu 2,5% NaCl dalam buffer (Grabe and Oster, 1980).

Pewarnaan nonspesifik biasanya dihasilkan oleh protein non-immunologis bermuatan tinggi yang terdapat dalam jaringan. Pengikatan reagen berikutnya tidak hanya terdapat pada ikatan spesifik tetapi juga ikatan nonspesifik sehingga menimbulkan pewarnaan yang positif. Penambahan protein akan menjenuhkan dan menetralkan lokasi bermuatan sehingga memungkinkan untuk membentuk ikatan hanya dengan antigen spesifik saja (Bancroft dan Gamble, 2008). Protein yang dapat ditambahkan adalah *normal serum*. Penelitian yang telah dilakukan di atas menunjukkan bahwa *normal serum* dapat juga diganti dengan susu skim Indomilk® 2% dan 3% karena mereka memiliki fungsi dan cara kerja yang sama dengan *normal serum*, yaitu menghalangi ikatan nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Susu skim mengandung dua jenis protein, yaitu protein kasein (76 –

80%) dan non kasein (14 – 24%), di mana protein yang berperan pada pengikatan nonspesifik adalah jenis protein kasein (Kumar et al, 2009 ; Thompson et al, 1965). *Blocking agent* yang juga efektif untuk menghalangi ikatan nonspesifik menurut penelitian yang dilakukan oleh Kim et al (2003) adalah *tryptone casein peptone*.

*American Society Clinical Oncology/Collage of American Pathologis* belum memberikan patokan tentang *blocking agent* standar yang dapat digunakan saat proses *protein blocking* pada pemeriksaan IHC HER2 untuk kanker payudara. Beberapa referensi hanya menyebutkan bahwa diperlukan larutan protein untuk proses *protein blocking*. Hasil dari penelitian di atas dapat dilihat bahwa pada pengecatan IHC yang menggunakan susu skim Indomilk® 1% telah terjadi peningkatan intensitas HER2 apabila dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan *normal serum*. Intensitas yang tinggi ini disebabkan oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Antibodi primer bersifat spesifik sehingga hanya akan berikatan dengan antigen spesifik pula, namun antibodi sekunder bersifat universal yang dapat membentuk ikatan spesifik dengan antibodi primer maupun nonspesifik dengan protein nonspesifik pada jaringan. Rendahnya konsentrasi protein yang terdapat dalam susu skim Indomilk® 1% akan menurunkan kemampuannya berikatan dengan protein nonspesifik sehingga kemungkinan antibodi sekunder untuk berikatan dengan antigen nonspesifik menjadi tinggi (Irawan, 2013).

Tingginya intensitas *background staining* tidak disebabkan oleh jenis *blocking agent* yang digunakan, melainkan konsentrasi protein dalam *blocking*

*agent* yang digunakan untuk menghalangi ikatan non spesifik yang terbentuk. Susu skim Indomilk® 1% memiliki konsentrasi protein yang lebih rendah daripada 2% dan 3% sehingga memungkinkan untuk protein nonspesifik lain yang tidak dihalangi oleh protein susu skim Indomilk® 1% berikatan dengan antibodi sekunder. Beberapa *blocking agent* yang berfungsi untuk menghalangi ikatan nonspesifik perlu dikembangkan (Duhamel and Johnson, 1985 ; Vogt et al., 1987).

Hasil uji statistik dengan fasilitas *Kruskal-Wallis*, intensitas pengecatan IHC HER2 menggunakan susu skim Indomilk® dan *normal serum* didapatkan bahwa nilai signifikansi = 0,012 atau nilai signifikansi lebih rendah dari taraf signifikansi (0,005) maka  $H_0$  ditolak, hal itu berarti bahwa terdapat perbedaan intensitas dari hasil pengecatan IHC HER2 menggunakan susu skim Indomilk® dan *normal serum*. Uji statistik dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing *blocking agent* yang digunakan. Hasil uji *Post Hoc Tukey* untuk *normal serum* terhadap susu skim Indomilk® 1% menunjukkan bahwa nilai signifikansi = 0,000 < 0,005 maka  $H_0$  ditolak yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara *normal serum* dengan susu skim Indomilk® 1%, sedangkan dua konsentrasi susu skim Indomilk® yang lain yaitu 2% dan 3% memiliki nilai signifikansi yang lebih besar dari taraf signifikansi maka  $H_0$  diterima yang itu berarti bahwa tidak terdapat perbedaan antara *normal serum* dengan susu skim Indomilk® 2%, *normal serum* dengan susu skim Indomilk® 3%, maupun susu skim Indomilk® 2% dengan susu skim Indomilk® 3%.

## BAB V

### SIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gambaran pengecatan IHC HER2 menggunakan *normal serum* didapatkan hasil +2, susu skim Indomilk® 1% didapatkan hasil +3, susu skim Indomilk® 2% didapatkan hasil +2, dan susu skim Indomilk® 3% didapatkan hasil +2. Pembacaan intensitas HER2 pada pengecatan IHC menggunakan susu skim Indomilk® 1% memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *normal serum*, susu skim Indomilk® 2%, dan susu skim Indomilk® 3%. Hasil pembacaan intensitas pengecatan IHC HER2 antara *normal serum* dengan susu skim 2% dan 3% tidak menunjukkan adanya perbedaan. *Normal serum* dapat diganti dengan susu skim Indomilk® 2%

#### 5.2 Saran

*Protein blocking* pada pengecatan IHC HER2 dapat menggunakan *blocking agent* berupa susu skim Indomilk® 2%. Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan menggunakan *blocking agent* berupa larutan protein yang lain sehingga lebih bervariasi. Selain itu penelitian juga dapat dikembangkan dengan melakukan modifikasi lain pada prosedur pengecatan IHC seperti penggantian metode fiksasi dan *antigen retrieval* yang digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afriani N, Krisnuhoni E, dan Rahadiani N. 2015. Ekspresi HER2/neu (c-ErbB2) pada kanker kolorektal. *Artikel Universitas Andalas dan Universitas Indonesia*.
- ASCO/CAP HER2 Test Guidelines Recommendation 2013.
- Bancroft JD dan Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques: Immunohistochemical Techniques*. United State: Churchill Livingstone Elsevier p.433-53.
- Citri A dan Yarden Y. 2006. EGF-ERBB signaling: towards the system level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7 (7): 505-7.
- Caussen L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et.al. 2005. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science Journal* 230 (4730): 1132-9.
- Dabbs DJ. 2013. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications: Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standarization 4th Edition*. United States of America: Elsevier Saunders p.1-19.
- Duhamel RC dan Johnson DA. 1985. Use of nonfat dry milk to block nonspecific nuclear and membrane staining by avidin conjugates. *J Histochem Cytochem* 33: 711-4.
- Ginting N dan Pasaribu E. 2005. Pengaruh temperatur dalam pembuatan yoghurt dari berbagai jenis susu dengan menggunakan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. *Jurnal Agribisnis Peternakan* 1(2).
- Gown AM. 2008. ASCO-CAP HER2 testing guidelines and validation studies. *Connection*: 51.
- Grabe M dan Oster G. 1980. Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol* 117: 339-44.
- Hartman BK. 1973. Immunofluoresence of dopamine- $\beta$ -hydroxylase application of improved methodology to the localization of the peripheral and central noradrenergic nervous system. *J Histochem Cytochem* 21: 312-9.
- Hastuti NW dan Lubis HML. 2011. Manfaat pemeriksaan imunohisto(sito)kimia. *CDK* 38 (5).
- Howard GC dan Kaser MR. 2014. *Making and Using Antibodies 2nd Edition*. Prancis: CRC Press p.303-9
- Irawan, Vidya. *IHC part 3: Normal Serum dan Immunofluoresence*. <http://vetsciencereview.blogspot.co.id/2015/11/ihc-part-3-normal-serum-dan.html>. 13 November 2013 (diakses pada 16 Juli 2016)

- Kim SH, Shin YK, Lee KM, Lee JS, Yun JH, Lee SM. 2003. An improved protocol of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51(1): 131.
- Kumar GL, Wendelboe HG, Bisgaard K, Boenisch T, Farmilo AD, Stead RH, et al. 2009. *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition*. California: DAKO Corporation. p.120.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. 2010. *Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease 8th Edition*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Kumar V, Cotran RS, dan Collins T. 2005. *Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease 7th Edition*. Philadelphia: WB Saunders. p.269-71.
- Latja A. 2007. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Methods in Immunohistochemistry 3rd Edition*. Canada: Springer.
- Ledford H. 2011. Cancer theory faces doubts. *Nature* 472: 273
- Mayr D, Kanitz V, Ammann G, Engel J, Burges A, Lohrs U, Diebold. 2006. HER2/neu gene amplification in ovarian tumors: a comprehensive immunohistochemical and FISH analysis on tissue microarrays. *Histopathology* 48: 149-56.
- Moasser MM. 2007. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26: 6469-87.
- Park MHM, Ebel JJ, Zhao W, Zynger DC. 2014. ER and PR immunohistochemistry and HER2 FISH versus oncotype DX: implication for breast cancer treatment. *The Breast Journal* 20 (1): 37-45.
- Platero JS. 2009. *Molecular Pathology in Drug Discovery and Development*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc p.227.
- Prichard JW. 2014. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 138.
- Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI tahun 2015. Stop Kanker.
- Radig J. *Immunohistochemistry on Basics: Blocking Non-specific Staining*. <http://bitesizebio.com/13466/immunohistochemistry-basics-blocking-non-specific-staining/>, 19 November 2013 (diakses pada 4 Desember 2015)
- Shi Y, Huang W, dan Tan Y. 2009. A novel proximity assay for the detection of proteins and protein complexes: quantitation of HER1 and HER2 total protein expression and homodimerization in formalin-fixed, paraffin-embedded cell lines and breast cancer tissue. *Diagn Mol Pathol* 18(1): 11-21.
- Stratton MR, Campbell PJ, dan Futreal PA. 2009. The cancer genome. *Nature* 458.
- Stricker TP dan Kumar V. 2010. *Neoplasia. Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease 8th Edition*. Philadelphia: Saunders Elsevier. p.259-62.

- Suryaningsih YW, Dwiloka B dan Setiani BE. 2015. Substitusi susu skim dengan tepung kedelai sebagai bahan pengikat fungsional nugget daging kerbau. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 4(1).
- Taylor CR dan Cote RJ. 2006. *Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for The Surgical Pathologist 3rd Edition*. Philadelphia: Elsevier.
- Tai W, Mahato R, dan Cheng K. 2010. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Controlled Released* 146.
- Thompson MP, Tarrasuk NP, James R, Lillevik HA, Aswirth UI, Pose D. 1965 Nomenclature of proteins of cow milk and revision. *J. Dairy Sci*: 157.
- Tjandra, L. 2010. Protoonkogen. *Jurnal UWKS* 2(1).
- Utami I. 2009. *Hubungan antara pengetahuan gizi ibu mengenai susu dan faktor lainnya dengan riwayat konsumsi susu selama masa usia sekolah dasar pada siswa kelas 1 SMP Negeri 102 dan SMP 1 PB Sudirman Jakarta Timur tahun 2009*. Skripsi. Jakarta: Universitas Indonesia.
- Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V. 2008. The role of ATF-2 in oncogenesis. *Bioassay* 30 (4).
- Vogt RF Jr, Philips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. 1987. Quantitative difference among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 101: 45.
- Walker RA. 2006. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods utility and semiquantitative assessment. *Histopathology* 49: 406-10.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allerd DC, Cote RJ, et al. 2007. American Society of Clinical Oncology/Collage of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breath cancer. *Arch Pathol Lab Med* 131(1): 18-20.
- Wulandari, RD. 2008. Genetika Kanker. *Jurnal UWKS* 2(1).
- Yamashita-Kashima Y, Shu S, Yorozu K, Hashizume K, Moriya Y, Fujimoto-Ouchi K, et al. 2014. Importance of formalin fixing condition for HER2 testing in gastric cancer: immunohistochemical staining and fluorensence in situ hybridization. *Springer* 17: 638-47.
- Yildirim S, Dandin O, Durmus M, Karapinar U, Aslan M, Gokce M, et al. 2012. C-erBb2 (HER2/neu) expression rate and its association with clinicopathologic parameters in gastric cancer. *UHOD International Journal of Hematology and Oncology* 22(3): 156-62.
- Yildis-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. 2012. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of esterogen receptor, progesteron receptor, and HER2 expression in invasive breast cancer. *Modern Pathology* 25: 1098-105.

Lampiran 1: Hasil uji Kruskal-Wallis

**Descriptive Statistics**

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Percentiles		
						25th	50th (Median)	75th
skor HER2	12	2.25	.452	2	3	2.00	2.00	2.75
blocking agent	12	1.50	1.168	0	3	.25	1.50	2.75

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	skor HER2
Chi-Square	11.000
df	3
Asymp. Sig.	.012

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: blocking agent





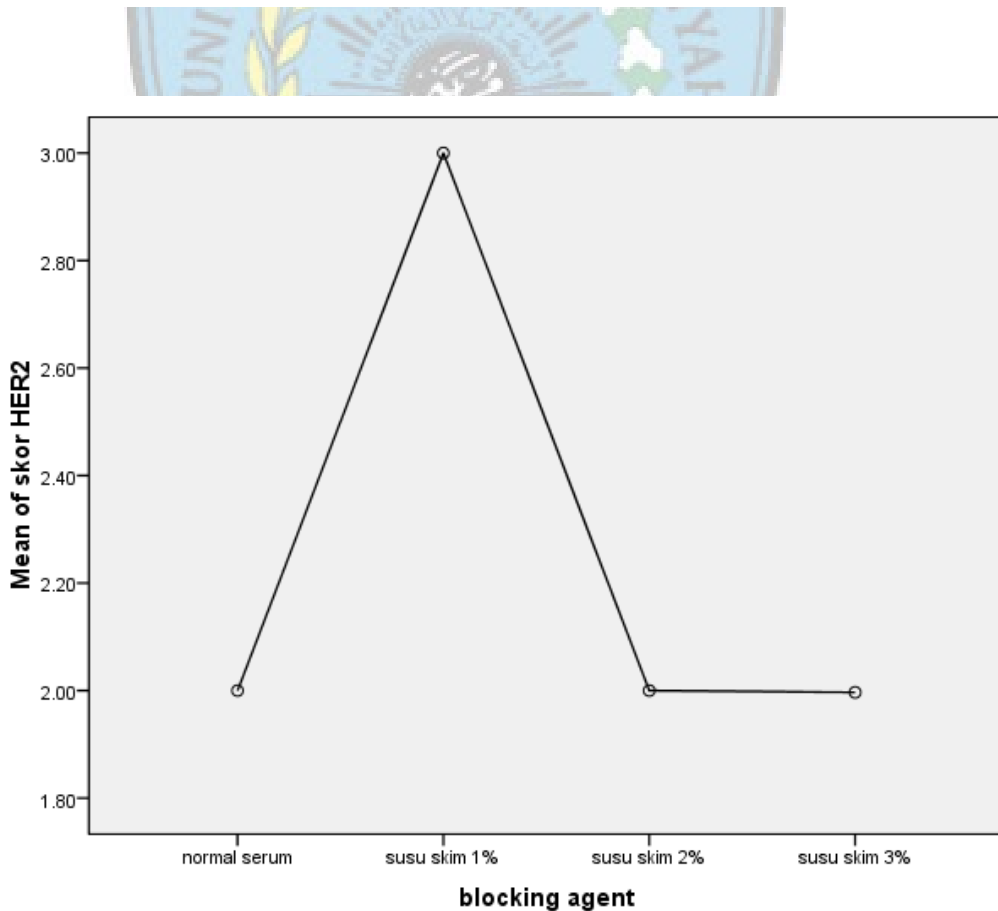
Lampiran 2: Hasil uji Post Hoc pada One Way Anova

**Multiple Comparisons**

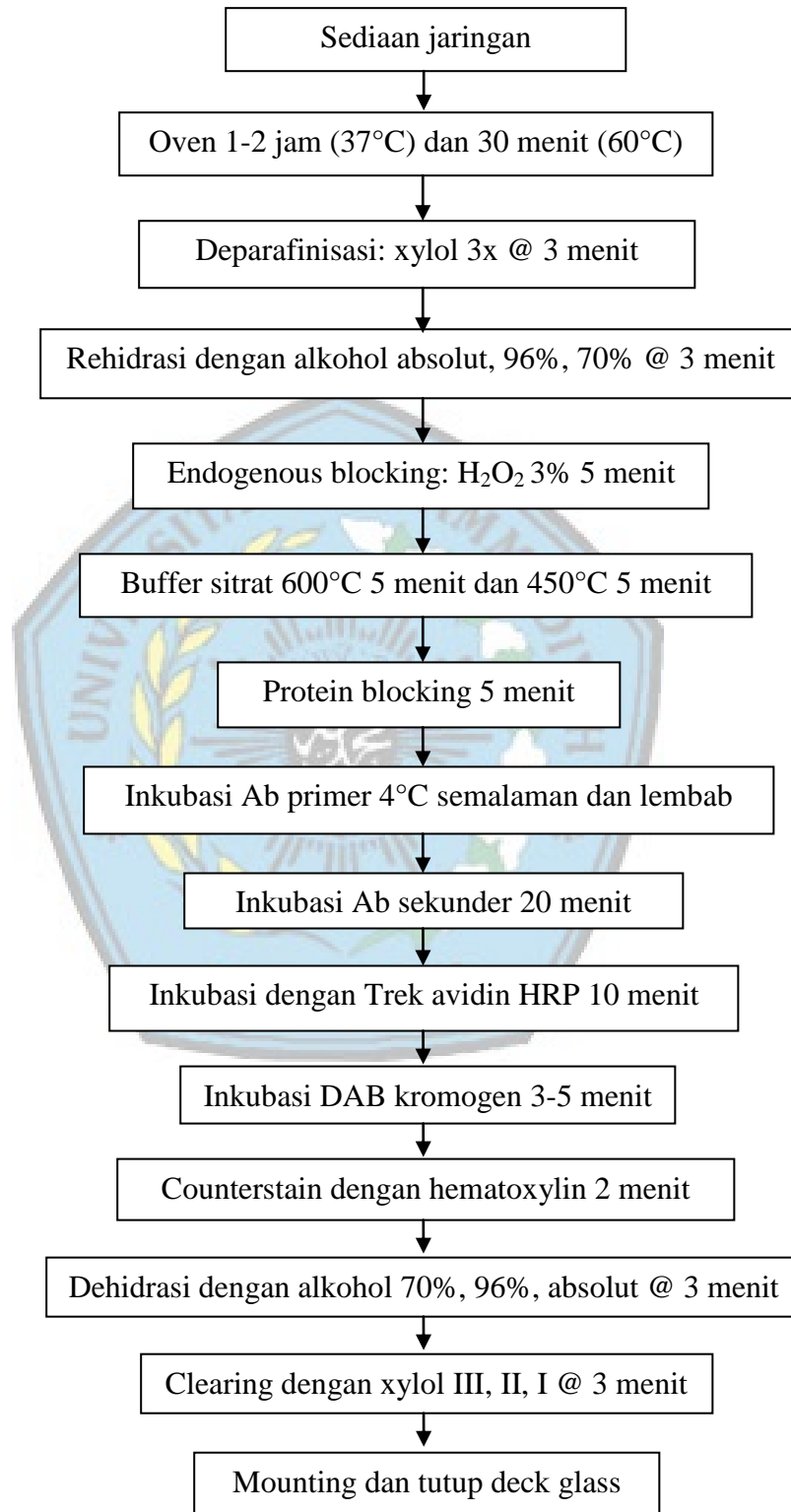
skor HER2  
Tukey HSD

(I) blocking agent	(J) blocking agent	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
normal serum	susu skim 1%	-.100000 <sup>*</sup>	.02014	.000	-1.0645	-.9355
	susu skim 2%	.000000	.02014	1.000	-.0645	.0645
	susu skim 3%	.003333	.02014	.998	-.0612	.0678
susu skim 1%	normal serum	1.000000 <sup>*</sup>	.02014	.000	.9355	1.0645
	susu skim 2%	1.000000 <sup>*</sup>	.02014	.000	.9355	1.0645
	susu skim 3%	1.003333 <sup>*</sup>	.02014	.000	.9388	1.0678
susu skim 2%	normal serum	-.000000	.02014	1.000	-.0645	.0645
	susu skim 1%	-1.000000 <sup>*</sup>	.02014	.000	-1.0645	-.9355
	susu skim 3%	.003333	.02014	.998	-.0612	.0678
susu skim 3%	normal serum	-.003333	.02014	.998	-.0678	.0612
	susu skim 1%	-1.003333 <sup>*</sup>	.02014	.000	-1.0678	-.9388
	susu skim 2%	-.003333	.02014	.998	-.0678	.0612

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 3. Skema prosedur pengecatan IHC



#### Lampiran 4. Preparasi Reagen

##### 1. Larutan PBS pH 7,2

Ditimbang NaCl sebanyak 42,2 gram; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,66 gram; dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,72 gram. Kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquades dan diatur pH larutan sampai 7,2 menggunakan pH meter.

##### 2. Xylol I, II, III

Sebanyak @100 ml xylol dituang pada tiga staining jar dan diberi identitas xylol I, xylol II, xylol III.

##### 3. Alkohol 70%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 96\% = 100 \text{ ml} \times 70\%$$

$$V_1 = 72,92 \text{ ml}$$

$$V_1 = 73 \text{ ml}$$

73 ml alkohol 96% ditambah dengan 27 ml aquades.

##### 4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 30\% = 100 \text{ ml} \times 3\%$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pekat diencerkan dengan metanol sebanyak 90 ml.

##### 5. Buffer sitrat

100 ml larutan PBS pH 7,2 ditambah dengan 1 ml Na sitrat 38%.

##### 6. Susu skim Indomilk® 1%

0,1 gram susu skim Indomilk® dilarutkan dalam 10 ml PBS pH 7,2.

##### 7. Susu skim Indomilk® 2%

0,2 gram susu skim Indomilk® dilarutkan dalam 10 ml PBS pH 7,2.

##### 8. Susu skim Indomilk® 3%

0,3 gram susu skim Indomilk® dilarutkan dalam 10 ml PBS pH 7,2.

##### 9. Antibodi primer (pengenceran 1:100)

Ditambahkan sebanyak 15 ul antibodi primer *rabbit IgG monoclonal biocare medical c-erbB-2/HER-2 #cat CME 342 A* ke dalam 1485 ul *diluent Da Vinci Green*. Tempat atau *microtube* yang digunakan harus steril.

**10. Kromogen DAB (1:30)**

*Microtube* ditutup dengan aluminium foil untuk menjaga kondisi wadah tetap dalam keadaan gelap. Ditambahkan sebanyak 50 ul betazoid DAB chromogen ke dalam 1450 ul betazoid DAB buffer.



Lampiran 5. Dokumentasi pelaksanaan penelitian



Pembuatan reagen PBS



Penimbangan susu skim



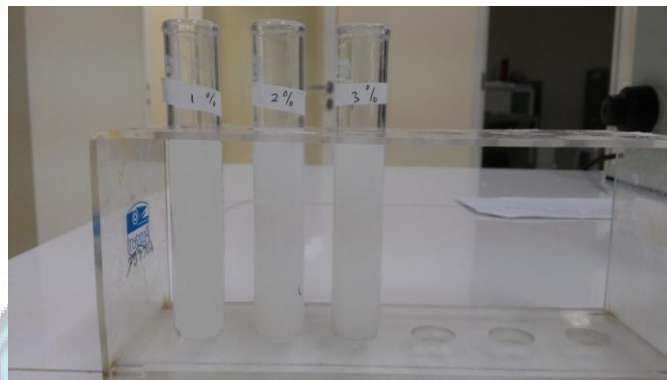
Hasil pengecatan IHC



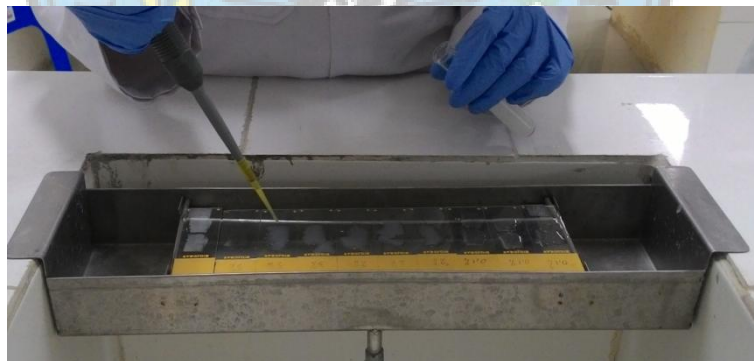
Pengecatan IHC tahap endogenous blocking



Pengecatan IHC tahap deparafinisasi



Susu skim 1%, 2%, 3% dalam PBS



Pengecatan IHC tahap protein blocking dengan susu skim



Proses counterstaining dengan hematoxylin



Antibodi primer HER2 Biocare



Reagen antibodi sekunder (Trekkie universal link), Trek avidin biotin HRP, normal serum (background sniper), betazoid DAB buffer, betazoid DAN chromogen