



**PERBEDAAN VARIASI SUHU PROSES DEPARAFINISASI
MENGUNAKAN AKUABIDES PADA PENGECATAN
IMUNOHISTOKIMIA *Esterogen Reseptor***

Manuscript



**PROGRAM STUDI D IV ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG
2018**

HALAMAN PERSETUJUAN

Manuscript dengan Judul

**PERBEDAAN VARIASI SUHU PROSES DEPARAFINISASI
MENGUNAKAN AKUABIDES PADA PENGECATAN
IMUNOHISTOKIMIA *Esterogen Reseptor***

Telah diperiksa dan disetujui untuk dipublikasikan

Semarang, Oktober 2018

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Arya Iswara, M.,Si. Med
NIK. 28.6.1026.224

**SURAT PERNYATAAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH**

Yang bertandatangan dibawah ini, saya :

Nama : Irmastuti Huda
Nim : G1C014038
Fakultas/Jurusan : D4 Analis Kesehatan
Jenis Penelitian : Skripsi
Judul : Perbedaan Variasi Suhu Proses Deparafinisasi Menggunakan
Akuabides Pada Pengecatan Imunohistokimia Esterogen Reseptor
Email : irmashuda12@gmail.com

Dengan ini menyatakan bahwa saya menyetujui untuk :

1. Memberikan hak bebas royalti kepada Perpustakaan Unimus atas penulisan karya ilmiah saya, demi pengembangan ilmu pengetahuan
2. Memberikan hak menyimpan, mengalih mediakan / mengalih formatkan, mengelola dalam bentuk pangakalan data (*database*), mendistribusikannya, serta menampilkannya dalam bentuk *softcopy* untuk kepentingan akademis kepada Perpustakaan Unimus, tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis / pencipta
3. Bersedia dan menjamin untuk menanggung secara pribadi tanpa melibatkan pihak Perpustakaan Unimus, dari semua bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran hak cipta dalam karya ilmiah ini.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 08 Oktober 2018
Yang Menyatakan



Irmastuti Huda

PERBEDAAN VARIASI SUHU PROSES DEPARAFINISASI MENGGUNAKAN AKUABIDES PADA PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA *Esterogen Reseptor*

Irmastuti Huda¹, Sri Sinto Dewi², Arya Iswara²

1. Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

2. Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

Info Artikel

Abstrak

Proses pengecatan imunohistokimia meliputi pengolahan jaringan, pemotongan jaringan, deparafinisasi, rehidrasi, antigen retrieval, peroxidase blocking, protein blocking, inkubasi antibodi, antibodi sekunder post primary, compact polymer, DAB, counterstain, dehidrasi, clearing, mounting. Deparafinisasi merupakan proses untuk menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan. Penelitian ini digunakan *deparaffinization agent* berupa aquabidest pemanasan dengan suhu 45°C, 50°C, 55°C, 60°C. Tujuan dari penelitian ini untuk melihat perbedaan variasi antara suhu aquabidest pada proses deparafinisasi pengecatan imunohistokimia *Esterogen Reseptor*. Sampel penelitian menggunakan blok jaringan Ca mammae +3. Deparafinisasi dengan aquabidest pemanasan diperoleh hasil intensitas pewarnaan dengan skor +1 intensitas lemah pada suhu 45°C, skor +1 intensitas lemah pada suhu 50°C, skor +2 intensitas sedang pada suhu 55°C, skor +3 intensitas kuat pada suhu 60°C. Penelitian ini terdapat perbedaan penggunaan aquabidest dengan pemanasan yang signifikan yaitu nilai $0,007 < 0,05$ dengan menggunakan uji statistik *Kruskal Wallis*. Proses deparafinisasi menggunakan aquabidest pemanasan terdapat perbedaan baik menggunakan *xylol* maupun aquabidest pemanasan.

Keyword

Akuabides, Deparafinisasi, Suhu

***Corresponding Author**

Anita Dian Maryani

Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

E-mail : irmashuda12@gmail.com

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di dunia. Penyakit kanker adalah penyakit yang timbul akibat pertumbuhan tidak normal sel pada jaringan tubuh yang berubah menjadi kanker (Kemenkes, 2015), salah satunya adalah kanker payudara. Kanker payudara merupakan penyebab kematian terbesar di setiap tahunnya, dan kedua terbanyak setelah kanker leher rahim pada wanita di Indonesia. Pada tahun 2014 sebanyak 519.000 wanita dilaporkan mengalami kematian akibat kanker payudara (Budiman dkk, 2013). Adanya kanker payudara dapat didiagnosis dengan cara pemeriksaan imunohistokimia.

Imunohistokimia adalah suatu metode yang bertujuan untuk menunjukkan adanya antigen didalam jaringan oleh antibodi spesifik (Nasution dkk, 2015). Prinsip metoda imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai dengan adanya reaksi antara antigen dengan antibodi sedangkan reaksi kimiawi ditandai dengan adanya reaksi antara enzim dengan substratnya. Reaksi imunohistokimia ini sifatnya spesifik, karena bahan yang dideteksi akan direaksikan dengan antibodi spesifik yang dilabel dengan suatu enzim. Enzim yang digunakan untuk melabeli antibodi tersebut adalah peroksidase. Antibodi dilabel dengan enzim peroksidase, substrat yang digunakan adalah peroksida. Untuk menandai adanya reaksi enzimatis maka digunakan suatu indikator warna (chromogen). Chromogen yang digunakan pada reaksi ini adalah DAB (3,3 diaminobenzidine) yang berwarna coklat (Widiarti *et al.*, 2009). Salah satu pemeriksaan yang sering dilakukan untuk mendiagnosis adanya kanker payudara yaitu dengan imunohistokimia metode *Esterogen Reseptor* (ER).

Esterogen Reseptor adalah sebagai prognostik dan faktor prediktif karsinoma payudara invasif. ER positif memprediksi terhadap respon terapi endokrin (Bauer *et al.*,

2007). ER positif merupakan marker penanda kanker payudara.

Pada proses pewarnaan imunohistokimia salah satu langkahnya adalah deparafinisasi. Prinsip deparafinisasi adalah menghilangkan parafin pada jaringan, dengan tujuan mempermudah antigen masuk kedalam jaringan. Pada proses deparafinisasi larutan yang digunakan adalah *xylol* I, *xylol* II, *xylol* III dan akuades masing-masing preparat direndam selama 3-5 menit (Sofian dan Kampono, 2005).

Xylol adalah golongan Hidrokarbon aromatik yang biasa digunakan sebagai pelarut atau dikombinasikan dengan senyawa organik dan juga sebagai proses kimia. *Xylol* merupakan senyawa yang berbahaya dan mempunyai resiko utama pada susunan saraf pusat. Dalam jangka pendek akan terjadi iritasi pada mata, mual muntah jika terhirup, gangguan pencernaan dan penyumbatan paru-paru jika tertelan. Dalam jangka panjang akan terjadi kesemutan, gangguan menstruasi, efek reproduksi, kejang jika terhirup, dan terjadi ruam kulit jika mengenai kulit (Cahyana *et al.*, 2015). Sehingga diperlukan bahan untuk menggantikan *xylol* bahan alternatif tersebut adalah akubides dengan pemanasan.

Bahan dan Metode

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *cross sectional* yaitu menguji perbedaan antara pemeriksaan imunohistokimia menggunakan akubides pemanasan dan *xylol* sebagai kontrol. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2017 sampai bulan Januari 2018 di Rumah Sakit Margono Purwokerto. Populasi penelitian ini adalah semua jaringan payudara yang terdapa di rumah sakit margono Purwokerto. Sampel penelitian ini menggunakan jaringan kanker payudara *Ca Mammae* yang sudah diketahui positif kanker payudara.

Kriteria Inklusi

- Jaringan positif 3 (+3) *Ca Mammæ* dari organ yang sama
- Blok parafin dengan kualitas dan kondisi baik yang masih bisa digunakan untuk pemeriksaan imunohistokimia

Kriteria Eksklusi

- Preparat jaringan dari pasien yang berbeda dan organ yang berbeda tidak boleh digunakan
- Blok parafin dengan kondisi kualitas yang tidak baik (rusak) tidak dapat digunakan untuk pemeriksaan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet, mikropipet, microwave, oven, beaker glass, objek glass polysilane. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *xylol*, alkohol, absolut, akuades, buffer sitrat, larutan PBS, entelan, H₂O₂ 3% dalam metanol, *Deparaffinization agent* (akuabides suhu 40°C, 50°C, 55°C, 60°C), antibodi primer *Esterogen Reseptor* (ER), antibodi sekunder (*Trekkie Universal Link*), *Trek* avidin HRP, kromogen DAB, dan hematoxylin. Penelitian dilakukan dengan empat perlakuan yaitu akuabides suhu 40°C, 50°C, 55°C, 60°C selama 4 menit diulang sebanyak 3 kali. Jaringan yang sudah memenuhi kriteria inklusi eksklusi lalu kemudian dilakukan pengolahan jaringan, pemotongan jaringan, pengecatan jaringan dengan pengecatan imunohistokimia deparafinisasi, rehidrasi, *antigen retrieval*, *peroxidase blocking*, *protein blocking*, inkubasi antibodi, antibodi sekunder, *compact polymer*, DAB, *Counterstain*, dehidrasi, clearing, mounting.

data yang sudah diperoleh dianalisa menggunakan program statistik komputer. Data dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Saphiro Wilk*, apabila hasil data normal maka menggunakan uji anova, sedangkan jika

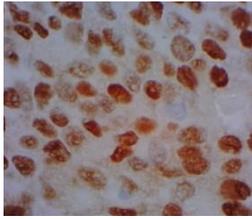
hasil tidak normal maka menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Untuk melihat perbedaan antara variabel menggunakan uji *Post Hoc Tukey*. Interpretasi skor hasil pengecatan imunohistokimia ER mengacu pada *American Journal Of Clinical Pathologi* dengan penilaian skor +1, +2, +3. Dengan nilai +1 intensitas warna pada inti sel terlihat samar atau lemah, +2 intensitas warna pada inti sel tampak tidak menyeluruh (utuh) atau bersifat sedang, +3 intensitas warna pada inti sel tampak menyeluruh (utuh) atau bersifat kuat.

Hasil

Tabel 1. Hasil rata-rata pengamatan pengecatan IHC ER dengan akuabides pemanasan untuk proses deparafinisasi

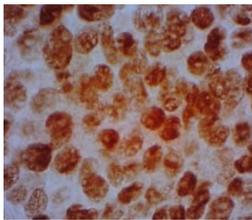
Agen Deparafinisasi	Pengulangan Penilaian Intensitas warna ER			Rata-rata hasil
	1	2	3	
Akubides suhu 45°C	+1	+1	+1	+1
Akubides suhu 50°C	+1	+1	+1	+1
Akubides suhu 55°C	+2	+2	+2	+2
Akubides suhu 60°C	+3	+3	+3	+3
Xylol (Kontrol)	+3	+3	+3	+3

Berdasarkan tabel 1. Pada suhu 45°C dan 50°C mendapatkan hasil skor yang sama yaitu +1 (positif 1), pada suhu 55°C mendapatkan hasil skor +2 (positif 2), dan pada suhu 60°C mendapatkan hasil skor +3 (positif 3). Semua perlakuan dibandingkan dengan *xylol* sebagai kontrol +3.



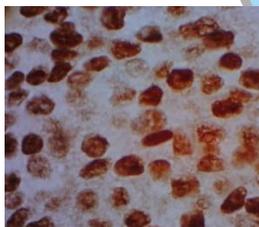
Gambar 1. hasil pengecatan dengan akuabides suhu 45°C.

Berdasarkan keterangan gambar 1 pengamatan hasil pengecatan menggunakan akuabides suhu 45°C didapatkan hasil skor 1 dengan intensitas warna pada inti sel terlihat samar atau lemah.



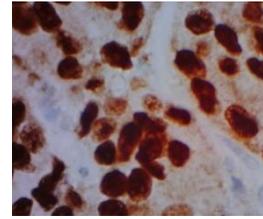
Gambar 2. hasil pengecatan dengan akuabides suhu 50°C.

Berdasarkan keterangan gambar 2 pengamatan hasil pengecatan menggunakan akuabides suhu 50°C didapatkan hasil skor 1 dengan intensitas warna pada inti sel terlihat samar atau lemah.



Gambar 3. hasil pengecatan dengan akuabides suhu 55°C.

Berdasarkan keterangan gambar 3 pengamatan hasil pengecatan menggunakan akuabides suhu 55°C didapatkan hasil skor 2 dengan intensitas warna pada inti sel tidak menyeluruh (utuh) atau bersifat sedang.



Gambar 4. hasil pengecatan dengan akuabides suhu 60°C.

Berdasarkan keterangan gambar 4 pengamatan hasil pengecatan menggunakan akuabides suhu 60°C didapatkan hasil skor 1 dengan intensitas warna pada inti sel tampak menyeluruh (utuh) atau bersifat kuat. Data pengecatan selanjutnya diuji secara statistik yaitu dengan uji normalitas menunjukkan nilai p value $0.001 < 0.05$ data tidak normal dan dilanjutkan uji *kruskal wallis* menunjukkan nilai p value $0.007 < 0.05$ data terdapat perbedaan antar perlakuan.

Diskusi

Hasil pengecatan imunohistokimia ER berdasarkan intensitas warna menggunakan akuabides dengan variasi suhu pemanasan yaitu 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C mengalami peningkatan skor intensitas warna. Suhu 60°C merupakan suhu yang baik pada proses deparafinisasi menggunakan akuabides dimana skor intensitas warna sama dengan kontrol (+3). Hal ini dikarenakan pengaruh dari titik leleh parafin pada suhu 53,7°C sehingga pada proses pengecatan sampel dapat menyerap cat dengan sempurna. Selain itu didukung juga pada proses antigen retrieval didalamnya dilakukan pemanasan suhu tinggi sampai pada suhu 100°C (Shujalpurkar and Vikey, 2016). Pada suhu 45°C sampai 60°C mengalami kenaikan skor intensitas warna apabila dibandingkan dengan kontrol yaitu menggunakan xylol (+3). Skor intensitas warna ER yang rendah disebabkan antibodi primer yang tidak berikatan dengan antigen pada jaringan karena parafin masih belum bersih secara sempurna. Suhu 45°C dan 50°C menghasilkan skor (+1) yang lebih rendah daripada suhu 55°C (+2) karena suhu 45°C dan 50°C dibawah suhu titik leleh parafin sehingga kurang optimal dalam

membersihkan parafin pada jaringan dan menutupi antigen untuk bereaksi dengan antibodi (Prabin, 2009).

Kesimpulan dan Saran

Ada perbedaan hasil pemeriksaan imunohistokimia dengan akuabides pemanasan dengan xylol dimana pada suhu 60°C menghasilkan hasil yang sama dengan kontrol

Diharapkan dapat dilakukan pengecatan imunohistokimia dengan metode lain seperti HER2 dan PR maupun selain pengecatan imunohistokimia

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Kepada kedua orang tua saya Bapak Nurkholis, Ibu Khomisah atas doa dan bimbingan secara material dan moril,
2. Dra. Sri Sinto Dewi, M.Si, Med Selaku pembimbing I yang telah memberikan petunjuk, semangat, motivasi dan ilmu yang bermanfaat, terhadap penulis untuk menyelesaikan skripsi ini,
3. Arya Iswara, M.Si. Med Selaku pembimbing II yang selalu memberikan semangat serta dengan sabar mengajarkan ilmu kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini,
4. Andri Sukei, SKM, M.Si Selaku ketua program studi yang telah memberikan motivasi dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini,
5. Moh Aji Saputra yang selalu memberikan material, moril dan motivasi
6. Teman – teman seperjuangan serta semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang turut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Referensi

Bauer, K.R., Brown, M., Cress, R.D., Parise, C.A. and Caggiano, V., 2007.

Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*, 109(9), pp.1721-1728.

Budiman, A., Khambri, D. and Bachtiar, H., 2013. Faktor yang mempengaruhi kepatuhan berobat pasien yang diterapi dengan tamoxifen setelah operasi kanker payudara. *Jurnal kesehatan andalas*, 2(1), pp.20-24.

Cahyana, G.H., Sukrisna, A. and Mulyani, T., 2017. Hubungan Paparan Xylene Dan Methyl Hippuric Acid Pada Pekerja Informal Pengecatan Mobil Di Karasak, Bandung. *Creative Research Journal*, 1(01), pp.79-94.

Kementerian Kesehatan, R.I., 2015. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. *Jakarta: Kementerian Kesehatan RI*.

Nasution, S.S., Setiyono, A. and Handharyani, E., 2015. Deteksi Imunohistokimia Antigen Coxiella Burnetii Sebagai Penyebab Q Fever Pada Sapi. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 9(2), pp.147-151

Prabin, S., Isha, S. and Kaoru, K., 2009. Immunohistochemistry: A review of practical procedure. *Nepal J Neurosci*, 6, pp.38-41.

Shujalpurkar, A. and Vikey, A., 2016. Basics of Immunohistochemical procedure. *IJAR*, 2(6), pp.883-886.

Widiarti, W., Boewono, D.T. and Widyastuti, U., 2009. Deteksi Antigen Virus Dengue pada Progeni Vektor Demam Berdarah dengan Metode Imunohistokimia. *Buletin Penelitian Kesehatan*, 37(3). pp.126-136