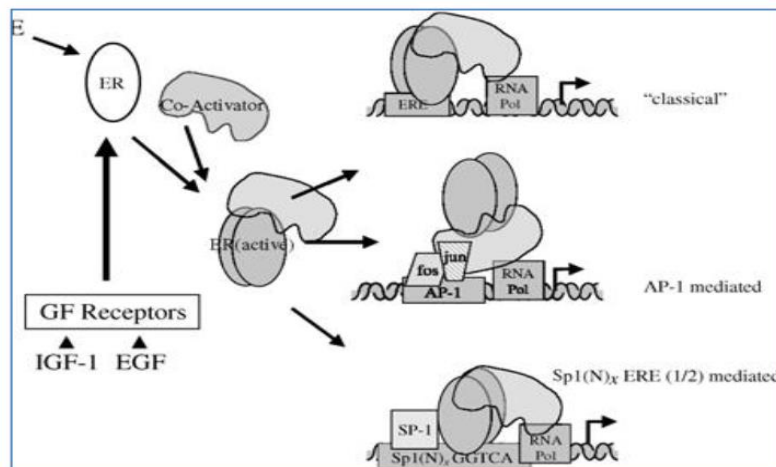


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Esterogen Reseptor (ER)*

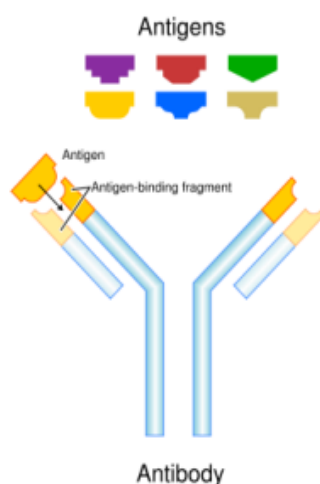
ER adalah grup protein yang ditemukan di dalam sel yang dapat mengaktifkan transkripsi. ER mempunyai struktur yang terdiri 6 *domain* yaitu A-F, 2 *transcriptional activation domain* (AF-1 dan AF-2) (Quzwain, 2017). Mekanisme proses karsinogenesis pada kanker payudara dapat terjadi melalui ikatan esterogen pada ER, menstimulasi proliferasi sel-sel payudara yang menimbulkan peningkatan pembelahan sel dan replikasi DNA yang menimbulkan mutasi, metabolisme esterogen memproduksi limbah yang toksik terhadap gen metabolit yang menyebabkan mutasi. ER mempunyai 2 sub tipe yaitu ER α dan ER β , keduanya merupakan faktor transkripsi yang memperantarai kerja esterogen dan mengikat estradiol pada lokasi yang sama. Kedua bentuk reseptor esterogen ini dikode oleh gen yang berbeda, yaitu ESR1 dan ESR2 pada kromosom 6 dan 14 (6q25 dan 14q). ER α ditemukan pada endometrium, sel-sel kanker payudara, sel stroma ovarium, dan di hipotalamus. Sedangkan ER β ditemukan pada ginjal, otak, tulang, jantung, mukosa usus, prostat, dan sel-sel endotel (Widjaja, 2004)



Gambar 1. Mekanisme aktivasi transkripsi ER (Quzwain, 2017)

2.2 Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah proses untuk mendeteksi antigen (protein, karbohidrat, dsb) pada sel dari jaringan dengan prinsip reaksi antibodi yang berikatan terhadap antigen pada jaringan. Nama imunohistokimia diambil dari nama “*immune*” yang menunjukkan bahwa prinsip dasar dalam proses ini ialah penggunaan antibodi dan “*histo*” menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia seringkali digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Nasution *et al.*, 2015). Hasil interaksi antara antigen dan antibodi biasanya dilihat dengan konjugasi antibodi dengan enzim seperti peroksidase (Bintari, 2016).



Gambar 2. Interaksi antara antigen dengan antibodi (Bintari, 2016)

2.2.1 Tahapan Dasar Immunohistokimia

Prosedur umum pengecatan imunohistokimia terdiri dari beberapa tahapan yaitu :

2.2.1.1 Deparafinisasi dan Rehidrasi

Deparafinisasi merupakan proses untuk menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan (Prabin, 2009). Bagian jaringan harus dideparafinisasi terlebih dahulu dengan *xylene* dan kemudian dicuci dalam pengenceran etanol bertingkat untuk menghilangkan pelarut organik dan parafin yang ada dalam jaringan (Mansour *et al.*, 2014). Sebelum melalui proses pengecatan, slide melewati proses deparafinisasi dan rehidrasi. Deparafinisasi meliputi perendaman dalam larutan *xylene* selama 2x5 menit (Suirta *et al.*, 2016).

Prosedur deparafinisasi immunohistokimia pada umumnya menggunakan *xylol*, yang berfungsi untuk menghilangkan parafin. Selain menggunakan *xylol* dapat menggunakan aquabidest dengan pemanasan yaitu dengan metode western blot. Block imunohistokimia yang biasanya menggunakan *xylol* akan digantikan dengan aquabidest dengan pemanasan (Mansour *et al.*, 2014).

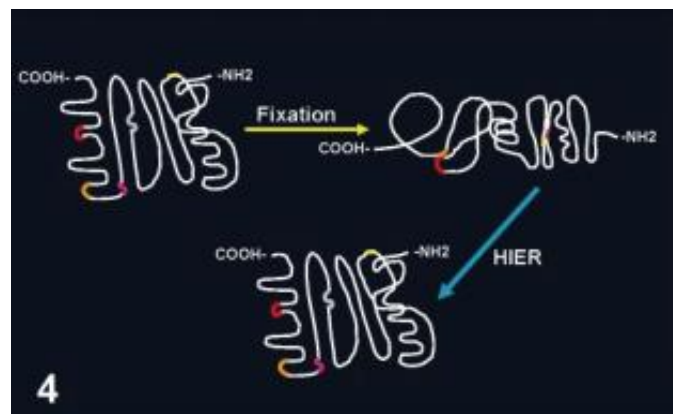
Rehidrasi merupakan proses memasukkan air ke dalam preparat jaringan pada objek glass setelah proses deparafinisasi (Sofian dan Kampono, 2005). Proses rehidrasi meliputi perendaman etanol konsentrasi 100% 96% 70%, masing-masing selama 2 menit dan dilakukan sebanyak 2 kali, setelah itu preparat direndam dengan aquadest selama 2-5 menit (Suirta *et al.*, 2016).

2.2.1.2 Endogenous Peroxidase Blocking

Endogenous peroxidase blocking merupakan proses yang sangat penting dalam imunohistokimia. Aktivitas dalam jaringan dan reaksi dengan antibodi menyebabkan *non spesific background staining*. Aktivitas *endogenous peroxidase* dapat dihilangkan dengan merendam jaringan dalam larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Prabin, 2009). Inaktivasi *endogenous peroxidase* dilakukan dengan cara meneteskan 3% H_2O_2 dalam PBS selama 30 menit pada suhu 37°C (Winaya *et al.*, 2014).

2.2.1.3 Antigen Retrieval

Proses antigen retrieval bertujuan untuk mengembalikan struktur protein atau antigen yang rusak pada saat proses fiksasi (Shujalpurkar and Vikey, 2016). Proses ini biasanya dilakukan dengan cara *enzimatic* dan *heat induced epitope retrieval* (HIER) (Shujalpurkar and Vikey, 2016). Dengan cara preparat direndam dengan TBS atau *Citrate Buffer Solution* lalu dilakukan pemanasan dengan suhu dan waktu tertentu dalam *microwave*, *boiling*, *steamer*, *waterbath* ataupun *inkubator* (Ramos-Vara, 2005).



Gambar 3. Metode AR yang dipanaskan (HIER)

2.2.1.4 Protein Blocking

Sebelum menggunakan antibodi yang bertujuan untuk mendeteksi antigen spesifik dalam pengecatan imunohistokimia, dilakukan proses protein blocking dengan prinsip larutan protein (*blocking agent*) akan berikatan dengan protein non spesifik yang ada pada jaringan sehingga akan membatasi adanya ikatan dengan antibodi (Masruro, 2016). Protein blocking dapat dilakukan menggunakan normal serum, atau larutan blocking seperti bovine serum albumin (BSA), gelatin, *tryptone casein peptone*, *non-fat dry milk* dan *casein* (Buchwalow *et al.*, 2011).

2.2.1.5 Inkubasi Antibodi

Antibodi adalah bagian dari pertahanan tubuh untuk menghilangkan atau mencegah adanya zat asing yang masuk ke dalam tubuh. Ada dua macam jenis antibodi yaitu antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal. Antibodi monoklonal merupakan pengembangan antibodi poliklonal. Antibodi ini hanya mengandung satu macam molekul antibodi yang hanya akan mengenali satu macam antigen. Berdasarkan sifat ini, maka antibodi monoklonal sangat spesifik jika digunakan untuk mendeteksi antigen. Antibodi poliklonal merupakan antibodi yang

mempunyai banyak molekul antibodi yang artinya antibodi poliklonal dapat mengenali lebih dari satu macam epitop antigen (Emantoko, 2001).

Antibodi didapat dengan cara mengumpulkan darah hewan yang telah diimunisasi. Antibodi yang didapat dari hiperimunisasi biasa disebut antibodi poliklonal. Produksi serum hiperimun (anti serum) didapat melalui imunisasi yang di berikan terhadap hewan dengan memasukkan antigen spesifik dalam tubuh hewan untuk mendapatkan antibodi yang didapatkan dari antigen tersebut (Bintari, 2016). Inkubasi diperlukan pada proses inkubasi antibodi primer. Kondisi inkubasi antibodi dipengaruhi oleh afinitas, suhu, karakteristik jaringan, dan prosedur. Untuk mencegah evaporasi dari larutan antibodi, inkubasi dilakukan pada kondisi lembab (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

2.2.2 Metode Pengecatan Imunohistokimia

Teknik pengecatan imunohistokimia adalah suatu metode untuk mengidentifikasi sel-sel spesifik berdasarkan komponen antigenik atau produk selulernya dengan reaksi kompleks antigen-antibodi. Teknik imunohistokimia dibedakan dalam dua metode yaitu teknik imunofluoresensi (*Fluorescence immunoassay / FIA*) dan teknik imunoenzim (*Direct methods, Indirect methods, Enzim-antienzim, Avidin-Biotin, Immunogold Silver Staining*). (Rahayu., 2004):

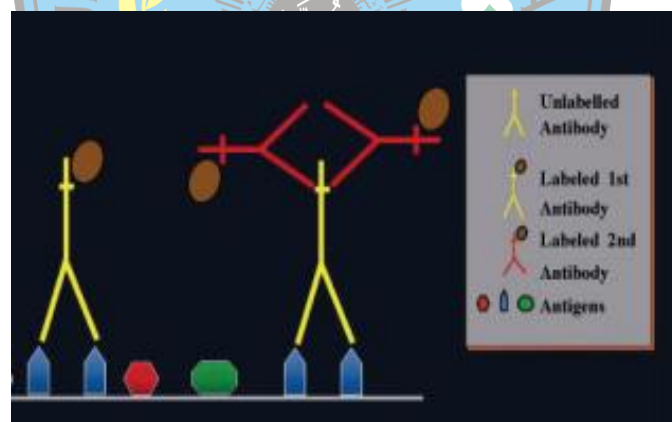
2.2.2.1 Metode Langsung (*Direct Methods*)

Metode langsung (*Direct Methods*) menggunakan hanya satu antibodi spesifik. Pada metode ini menggunakan enzim-antibodi konjugasi untuk mengikat enzim pada antigen yang terdapat dalam jaringan. Diinkubasi dengan substrat *hidrogen peroksida* dan *kromogen diamino-benzidine (DAB)*. Menghasilkan

reaksi warna coklat yang dapat dilihat dibawah mikroskop cahaya (Rahayu., 2004).

2.2.2.2 Metode Tidak Langsung (*Indirect Methods*)

Metode tidak langsung menggunakan dua macam antibodi yaitu antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer berfungsi untuk mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*) sehingga antibodi sekunder disebut dengan anti antibodi primer. Perlabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat kromogen yang merupakan suatu gugus senyawa kimia yang dapat terjadi perubahan warna jika bereaksi dengan senyawa lain (Ketut, 2014).



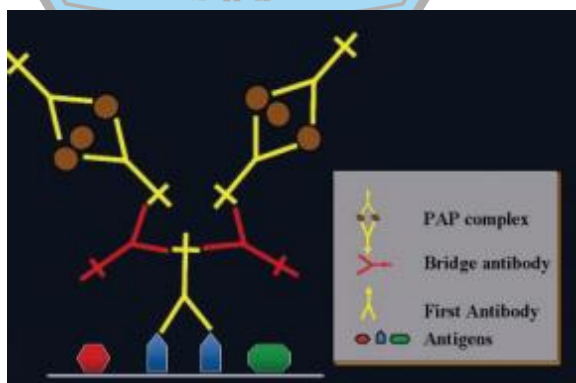
Gambar 4. *Direct methods* (A) , *indirect methods* (B) (Ramos-Vara, 2005)

2.2.2.3 Metode Berlapis (Multiple-layer Methods)

Metode imunohistokimia yang termasuk dalam metode berlapis diantaranya yaitu metode peroxidase-antiperoxidase (PAP) dan metode avidin-biotin complex (ABC) (Ramos-Vara *et al.*, 2008) :

2.2.2.3.1 Metode Peroxidase-Anti Peroxidase (PAP)

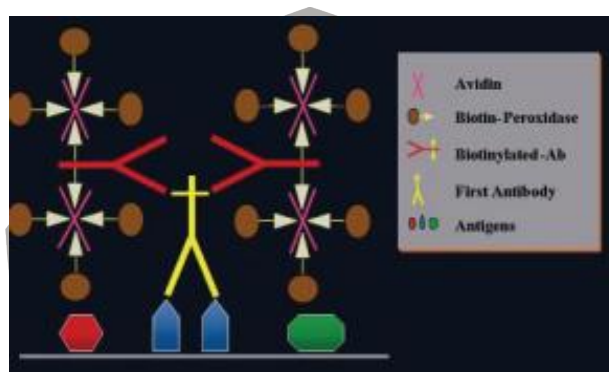
Antibodi primer tidak dilabel, sebagai gantinya antibodi antienzim digunakan untuk membentuk jembatan antara antibodi primer dan enzim. Teknik ini mencegah perlunya konjugasi enzim pada antibodi. Metode ini mempunyai sensitivitas 100 sampai 1000 kali lebih besar daripada teknik konjugasi/ tidak langsung. Kompleks metode PAP adalah reagen tersier yang terdiri dari kompleks antibodi yang stabil melawan HRP (*Horseradish Peroxidase*) dan antigen HRP. Antibodi primer berkembang melawan antigen manusia, mengikat antigen jaringan pada bagian Fab-nya. Reagen sekunder (*bridge reagen*) sebaliknya, membentuk suatu jembatan molekuler antara antibodi primer dan imunoglobulin dalam kompleks PAP (Rahayu., 2004)



Gambar 5. Metode Peroxidase-antiperoxidae (PAP) (Ramos-Vara, 2005)

2.2.2.3.2 Metode Avidin-Biotin Complex (ABC)

Metode Avidin-Biotin Complex menunjukkan afinitas tinggi ikatan antara avidin dan biotin. Avidin yang berkonjugasi pada HRP akan membuat ikatan kuat dari avidin ke antibodi biotinylated, sehingga menempatkan peroksidase pada tempat reaksi antigen-antibodi dalam potongan jaringan. Metode ini lebih cepat digunakan sebagai prosedur tidak langsung, namun tidak sensitif pada metode PAP (Rahayu, 2004).



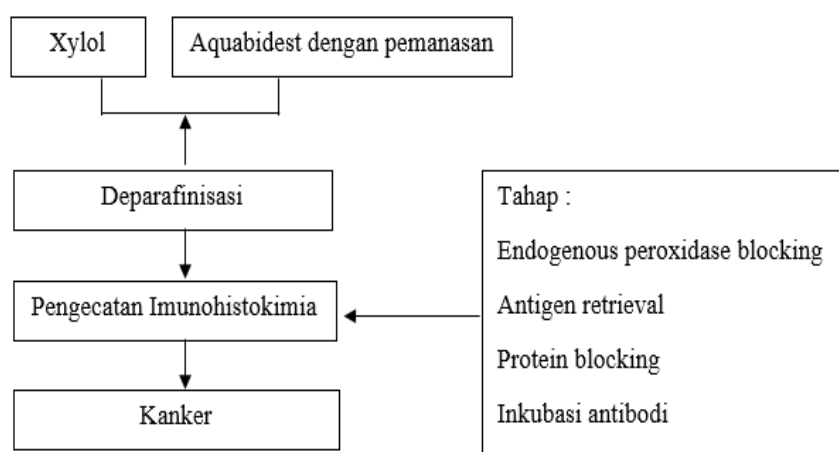
Gambar 6. Metode Avidin Biotin Complex (ABC) (Ramos-Vara, 2005)

2.3 Hasil Pengecatan Imunohistokimia

Pembacaan hasil pengecatan Imunohistokimia ER dibaca dibawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x sebanyak 100 sel. Hasil ER positif (+) ditandai dengan warna coklat yang terdapat pada inti sel dan sitoplasma. Warna coklat yang terdapat pada inti sel dan sitoplasma dikarenakan, peroksidase pada ikatan *Avidin Biotin Complex* akan bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama kromogen sehingga menimbulkan visualisasi warna pada sel yang mengandung antigen, dimana proses awal terjadinya antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang berlabel biotin, biotin yang berada pada antibodi sekunder akan diikat oleh biotin complex

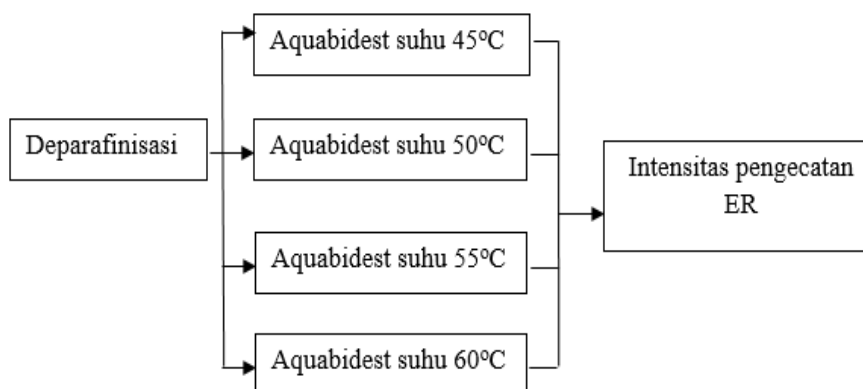
yang mengandung peroxidase. Peroxidase pada rangkaian avidin biotin akan bereaksi dengan substrat H_2O_2 /kromogen (Rahayu, 2004). Intensitas yang didapat dicocokkan dengan *AJCP (American Journal Of Clinical Pathologi)* 2013.

2.4 Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka teori penelitian

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 8. Kerangka konsep penelitian

2.6 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu tidak ada perbedaan intensitas *Esterogen Reseptor* yang dihasilkan dari pengecatan Imunohistokimia baik menggunakan *Xylol* maupun *Aquabidest* dengan pemanasan.

