

**PUTIH TELUR PUYUH SEBAGAI BLOCKING PROTEIN
PADA PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA
DENGAN ANTIBODI HER2**

Manuscript



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

PERNYATAAN PERSETUJUAN

Manuscript

Dengan Judul

PUTIH TELUR PUYUH SEBAGAI BLOCKING PROTEIN PADA PENGECATAN IMMUNOHISTOKIMIA DENGAN ANTIBODI HER2

Telah diperiksa dan disetujui untuk dipublikasikan

Semarang, 19 Oktober 2018



Pembimbing II

Arya Iswara, M.Si.Med

NIK. 28.6.1026.224

SURAT PERNYATAAN
PUBLIKASI TUGAS AKHIR

Yang bertandatangan di bawah ini, saya:

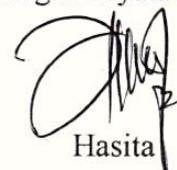
Nama : Hasita
NIM : G1C217245
Fakultas/Jurusan : FIKKES/D4 Analis Kesehatan
Jenis Penelitian : Skripsi
Judul : PUTIH TELUR PUYUH SEBAGAI BLOCKING
PROTEIN PADA PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA
DENGAN ANTIBODI HER2
Email : lthaomext2@gmail.com

Dengan ini menyatakan bahwa saya menyetujui untuk:

1. Memberikan hak bebas royalti kepada perpustakaan Unimus atas penulisan tugas akhir saya, demi pengembangan ilmu pengetahuan
2. Memberikan hak menyimpan, mengalih mediakan/mengalih formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, serta menampilkan 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 tugas akhir ini.

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

Semarang, 19 Oktober 2018
Yang Menyatakan


Hasita

PUTIH TELUR PUYUH SEBAGAI BLOCKING PROTEIN PADA PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIADENGAN ANTIBODI HER2

Hasita¹, Sri Sinto Dewi², Arya Iswara²

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

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

Pendahuluan

Kanker adalah penyakit yang berhubungan dengan tidak terkontrol kecepatan pertumbuhan sel abnormal dalam tubuh. Sel tersebut dapat menginvasi jaringan sel disekitarnya dan menyebar keorgan lain. Proses ini dikenal sebagai metastasis. Kanker juga biasa disebut tumor ganas atau neoplasma. Kanker saat ini menjadi salah sat penyakit yang menjadi problem dunia (Jemal *et al*, 2011).

Menurut data *World Health Organization* (WHO) Tahun 2013, insidensi kanker meningkat dari 12,7 juta kasus tahun 2008

menjadi 14,1 juta kasus tahun 2012. Sedangkan jumlah kematian meningkat dari 7,6 juta orang tahun 2008 menjadi 8,2 juta pada tahun 2012. Kanker menjadi penyebab kematian nomor 2 di dunia sebesar 13% setelah penyakit kardiovaskular. Diperkirakan pada tahun 2030 insiden kanker dapat mencapai 26 juta orang dan 17 juta di antaranya meninggal akibat kanker, terlebih untuk negara miskin dan berkembang kejadiannya akan lebih cepat (Depkes, 2014). Adapun teknik yang dapat digunakan untuk pemeriksaan biomarker secara valid adalah

*Corresponding Author

Hasita

Program Studi D IV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273

Email: Ithaomext2@gmail.com

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. Imunohistokimia merupakan pemeriksaan imunopatologi yang potensial untuk memeriksa antigen secara local di jaringan yang menggunakan antibody spesifik (Hastuti dan Lubis, 2011).

Pengecatan IHC merupakan rangkaian 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). Blocking agent yang dapat digunakan untuk protein blocking pada pengecatan IHC diantaranya adalah normal serum, protein solution, dan komersial mixes. Blocking agent yang digunakan pada proses protein blocking belum ada yang dipatenkan sehingga dapat digunakan salah satu dari ketiga di atas.

Normal serum adalah blocking agent yang umum digunakan pada teknik IHC. Tujuan aplikasi *normal serum* pada prosedur pengecatan IHC adalah untuk mengikat ikatan non spesifik. Sebelum menggunakan antibody untuk mendeteksi antigen pada jaringan, ikatan yang nonspesifik pada jaringan harus dilakukan *blocking* untuk mencegah antibody berikatan dengan epitope yang non spesifik (Irawan, 2015). *Normal serum* dapat dikatakan sebagai blocking agent yang baik, akan tetapi kelemahan pada normal serum ini adalah harganya yang relative mahal.

Putih Telur puyuh sebagai sumber pangan dengan kandungan gizi cukup lengkap, yaitu meliputi karbohidrat, protein dan delapan macam asam amino yang berguna bagi tubuh. Telur puyuh mengandung protein kasar sekitar 13,30%, serat kasar 0,63%, lemak kasar 11,99%. Telur puyuh menjadi salah satu pangan kaya akan sumber energy yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan yang dimiliki oleh telur

puyuh memang diklaim mampu mencegah timbulnya sel kanker dalam tubuh (Thomas dkk., 2016).

HER2 adalah singkatan dari *Human Epidermal growth factor Receptor*, yang biasa disebut juga sebagai c-erbB-2/neu. Reseptor HER2 adalah reseptor membrane sel hasil ekspresi suatu HER2 gen pada kromosom 17 (Pinkas-kramarski et al., 1997). Protein reseptor HER2 mengatur pertumbuhan, perlekatan, pertahanan, perpindahan, dan diferensiasi suatu sel melalui suatu mekanisme pengiriman sinyal dari reseptor ke dalam nucleus. Fungsi pengaturan tersebut menjadi terganggu oleh sel kanker. (Hudis, 2007).

Protein blocking diterapkan sebelum menggunakan antibody untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan pada pengecatan IHC. Prinsip dari *protein blocking* adalah lautan protein (*blocking agent*) yang ditambahkan akan meningkatkan protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibody (Latja, 2007).

Tujuan dari penelitian Untuk menganalisis hasil pengecatan imunohistokimia HER2 menggunakan putih telur puyuh dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%

Bahan Dan Metode Penelitian

Jenis penelitian eksperimen. Desain penelitian *cross sectional* (potong lintang).

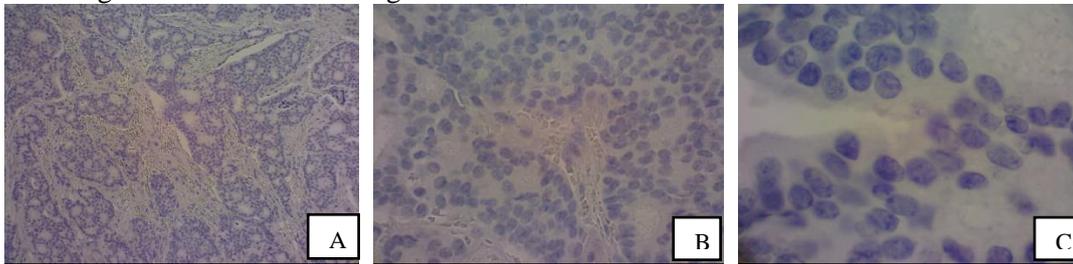
Sampel penelitian ini menggunakan blok parafin kanker payudara +3 HER2 dan konsentrasi putih telur puyuh 1%, 2%, 3%.

Bahan-bahan yang digunakan adalah Xylol, entelan, alkohol 70% dan 96%, aquades, buffer, sitrat, larutan PBS, H₂O₂ 3%, *blocking agent* (Putih telur puyuh), antibody primer monoclonal c-erbB-2/HER2 Biocare medical, antibody sekunder, kromogen DAB, dan hematoxylin.

Hasil

Hasil pengamatan secara mikroskopik dari pengecatan HER pada IHC dengan normal serum dan putih telur puyuh 1%, 2% dan 3% dapat dilihat pada gambar berikut:

a. Pengecatan IHC Kontrol Negatif

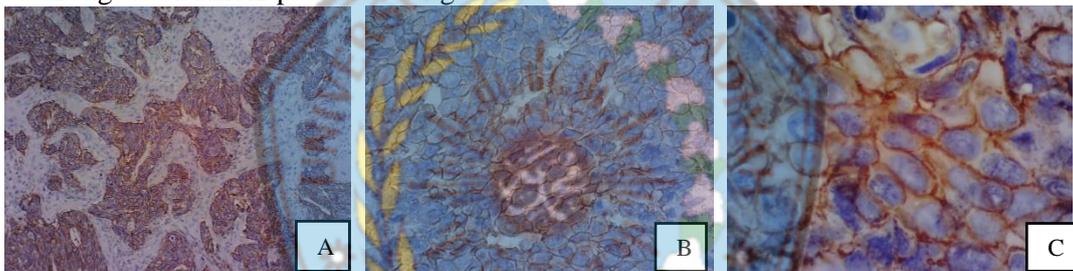


Gambar 1. Pengecatan HER2 kontrol Negatif tanpa kontrol negatif (A) pembesaran 100x, kontrol negatif (B) pembesaran 400x, kontrol negatif (C) pembesaran 1000x

Berdasarkan gambar diatas dapat dilihat pada gambar kontrol negatif dengan pembesaran 100x, 400x, 1000x, tidak tampak

intensitas warna coklat pada bagian membran sel

b. Pengecatan HER2 pada IHC dengan Normal Serum

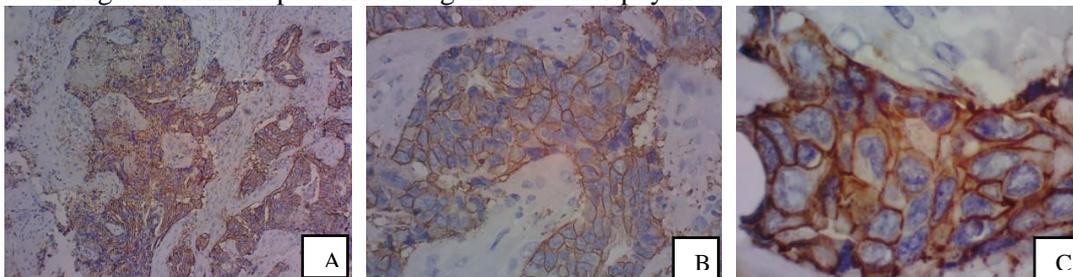


Gambar 2. Menggunakan menggunakan normal serum (A) pembesaran 100x, normal serum (B) pembesaran 400x, normal serum (C) pembesaran 1000x.

Pada pengecatan HER2 pada IHC menggunakan normal serum dengan pembesaran 100x tidak tampak jelas, dilanjutkan dengan pembesaran 400x intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sudah jelas, kemudian

menggunakan pembesaran 1000x intensitas warna, inti selnya warna coklat pada membran sel sangat tampak jelas, penyerapan cat pada normal serum berdasarkan gambar diatas dapat dinilai kuat.

c. Pengecatan HER2 pada IHC dengan Putih telur puyuh 1%

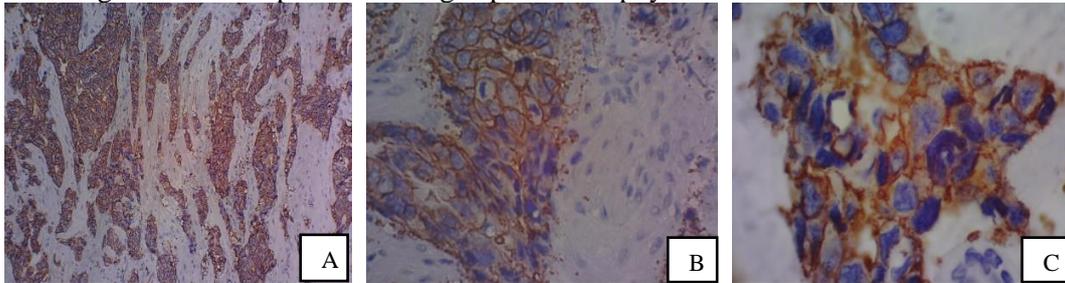


Gambar 3. Putih Telur puyuh 1% (A) pembesaran 100x, putih telur puyuh 1% (B) pembesaran 400x, putih telur puyuh 1% (C) pembesaran 1000x.

Pada pengecatan HER2 pada IHC menggunakan putih telur puyuh 1% menggunakan pembesaran 100x tidak tampak jelas, sedangkan pada pembesaran 400x sudah tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sudah

jelas, kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 1000x sangat tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sangat jelas, penyerapan cat pada putih telur puyuh 1% berdasarkan gambar diatas dapat dinilai kuat.

d. Pengecatan HER2 pada IHC dengan putih telur puyuh 2%



Gambar 4. Menggunakan Putih Telur Puyuh 2% (A) pembesaran 100x, putih telur puyuh 2% (B) pembesaran 400x, putih telur puyuh 2% (C) pembesaran 1000x

Pada pengecatan HER2 pada IHC menggunakan putih telur puyuh 2% menggunakan pembesaran 100x tidak tampak, sedangkan pada pembesaran 400x sudah tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sudah

jelas, kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 1000x sangat tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sangat jelas, penyerapan cat pada putih telur puyuh 2% berdasarkan gambar diatas dapat dinilai kuat.

e. Pengecatan HER2 pada IHC dengan putih telur puyuh 3%



Gambar 5. Menggunakan Putih Telur Puyuh 3% (A) pembesaran 100x, putih telur puyuh 3% (B) pembesaran 400x, putih telur puyuh 3% (C) pembesarn 1000x.

Pada pengecatan HER2 pada IHC menggunakan putih telur puyuh 3% menggunakan pembesaran 100x tidak tampak, sedangkan pada pembesaran 400x sudah tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sudah

jelas, kemudian dilanjutkan dengan pembesaran 1000x sangat tampak jelas intensitas warna, inti sel dan warna coklat pada membran sel sangat jelas, penyerapan cat pada putih telur puyuh 3% berdasarkan gambar diatas dapat dinilai sedang/lemah.

. Hasil ekspresi HER2 berdasarkan intensitasnya terhadap tiga sediaan (*slide*), dengan tiga perlakuan dan lima lapangan

pandang dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil pengamatan pengecatan HER2 pada IHC

Blocking Agent	Pengulangan 1					Pengulangan 2					Pengulangan 3				
	LP I	LP II	LP III	LP IV	LP V	LP I	LP II	LP III	LP IV	LP V	LP I	LP II	LP III	LP IV	LP V
Putih Telur Puyuh 1%	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Rata-rata	3					3					3				
Putih telur puyuh 2%	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3
Rata-rata	3					3					3				
Putih telur puyuh 3%	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Rata-rata	2					2					2				
Normal serum	LP I		LP II			LP III			LP IV		LP V				
	3		3			3			3		3				
Rata-rata	3														

Diskusi

Berdasarkan hasil pengamatan secara mikroskopik, dari 10 *slide blok parafin* kanker payudara +3 HER2 dengan pengecatan IHC, menggunakan *normal serum* didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 1% didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 2% didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 3% didapatkan hasil +2. Pembacaan hasil intensitas HER2 pada pengecatan IHC menggunakan putih telur puyuh 3% memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *normal serum* dan putih telur puyuh 1% dan 2%. Pada putih telur puyuh 1% tidak menunjukkan adanya perbedaan dengan normal serum, berarti normal serum dapat diganti dengan putih telur puyuh 1%.

Pewarnaan non spesifik dihasilkan oleh protein non-immunologis bermuatan tinggi yang terdapat dalam jaringan. Pengikatan reagen berikutnya tidak hanya terdapat pada ikatan spesifik tetapi juga pada ikatan non spesifik sehingga menimbulkan pewarnaan yang positif. Dilakukan penambahan protein untuk 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*. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diatas menunjukkan bahwa

normal serum dapat juga digantikan dengan Putih telur puyuh 1% dan 2% karena mereka memiliki fungsi dan cara kerja yang sama dengan *normal serum*, yaitu menghalangi ikatan nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Pada telur puyuh kandungan protein terdapat sebanyak 13.1% protein dibandingkan dengan kandungan ayam ras hanya 12.7% (Listiyowati dan Rospitasari, 2005).

Pada pemeriksaan IHC HER2 untuk kanker payudara, *American Society Clinical Oncology/Collage of American Pathologis* belum memberikan patokan tentang *blocking agent* standar yang dapat digunakan saat proses *protein blocking*. Hanya beberapa referensi menyebutkan bahwa diperlukan larutan protein untuk proses *protein blocking*. Hasil dari penelitian diatas dapat dilihat bahwa pada pengecatan IHC menggunakan putih telur puyuh 3% terjadi penurunan intensitas HER2 jika dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan *normal serum*. intensitas yang rendah disebabkan oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Antibodi primer bersifat spesifik sehingga hanya kan berikatan dengan antigen spesifik pula, namun antibodi sekunder bersifat universal yang dapat membentuk

dengan antibodi primer maupun nonspesifik dengan protein non spesifik pada jaringan. Terlalu tingginya konsentrasi protein yang terdapat dalam putih telur puyuh 3% akan memungkinkan terjadinya kerusakan kemampuan berikatan dengan protein nonspesifik sehingga antibodi sekunder untuk berikatan dengan antigen nonspesifik menjadi lemah/menurun. Tingginya intensitas *background staining* tidak disebabkan oleh jenis agent yang digunakan, melainkan konsentrasi protein dalam *blocking agent* yang digunakan untuk menghalangi ikatan non spesifik yang terbentuk. Putih telur puyuh 3% memiliki konsentrasi yang sangat tinggi dibanding dengan 1% dan 2% sehingga memungkinkan untuk protein nonspesifik lain yang di halangi oleh protein putih telur puyuh 1% tidak banyak berikatan dengan antibodi sekunder. Ada beberapa *blocking agent* yang berfungsi untuk menghalangi ikatan nonspesifik perlu dikembangkan (Duhamel and Johnson, 1985; Vogt et al., 1987)

Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian gambaran pengecatan imunohistokimia dapat disimpulkan bahwa hasil pengecatan imunohistokimia HER2 pada tahap blocking agent dengan menggunakan putih telur puyuh 1% dan 2%, sudah dapat memblocking dengan baik.
2. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gambaran pengecatan IHC HER2 menggunakan *normal serum* didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 1% didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 2% didapatkan hasil +3, putih telur puyuh 3% didapatkan hasil +2. Pembacaan hasil intensitas HER2 pada pengecatan IHC menggunakan putih telur puyuh 3% memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *normal serum* dengan putih telur puyuh 1% dan 2% tidak menunjukkan adanya perbedaan. Berarti normal serum dapat diganti dengan putih telur puyuh 1%.

Saran

Protein blocking pada pengecatan IHC HER2 dapat menggunakan *blocking agent* berupa putih telur puyuh 1%. Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan menggunakan *blocking agent* berupa larutan atau konsentrasi protein yang lain sehingga lebih bervariasi. Selain itu juga dapat dikembangkan dengan melakukan modifikasi lain pada prosedur pengecatan IHC.

Referensi

- Bancroft J dan Gamble M. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques Immunohistochemical Techniques*. United State Churchill Living stone Elsheis P.433-53
- Depkes. Pusat data dan informasi kementerian kesehatan Republik Indonesia. <http://www.depkes.go.id>. Diakses 4 Februari 2018
- 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: 771-4
- Hastuti NW and lubis Hml, 2011. Manfaat Pemeriksaan Imunohistokimia. CDK3 (5).
- Hudis, CA. 2007. Trastuzumab-mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 357 (1): 39-51
- Irawan, Vidya. IHC part 3: Normal Serum dan Imunofluoresence. <http://vetsciencereview.blogspot.co.id/2015/11/ihc-part-3-normal-serum-dan.html>. 13 November 2015 (diakses pada 2 September 2018)
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferkey J, Ward E, Forman D. Global Cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 2011; 61 (2) 69.
- Latja A. 2007. Handbook of neurochemistry and molecular Neurobiology: methods in Immunohistochemistry 3rd Edition. Canada: Springer.
- Listiyowati, E. dan K. Ropitasari. 2004. Puyuh Tata Laksana Budi Daya

- Secarakomersial. Penebar swadaya. Jakarta. Indonesia
- Park, MHM, ebel JJ. Zhao w, zinger DC. 2014 ER and PR Immunohistochemistry and HER2 Fish Versus oncotype PX: Implication for breast cancer treatmen. The breast journal 20 (1): 37
- Prichard JW. 2014. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 138.
- Thomas, K.s., PNR. Jagatheesan, T.L. Reetha dan D Rajendran 2016. Nutrient Composition of Japanese quails egg. *Inter.J. Scie. Envirom. And rech* 5 (3): 1293
- Voght RF Jr, Philips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. 1987. Quantitative difference among variousnproteins a blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 101:45

