VARIASI pH TRIS EDTA SEBAGAI *ANTIGEN RETRIEVAL* PADA PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA *ESTROGEN RESEPTOR*

Wiwin Yuni Relawati[1], Sri Sinto Dewi[2], Arya Iswara[2]

[1]*Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*
[2]*Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*

Info Artikel

Kata Kunci

Retrieval antigen, IHC, Tris EDTA

Abstrak

Antigen retrieval merupakan salah satu langkah dari pewarnaan imunohistokimia. Teknik sederhana antigen retrieval telah berperan penting dalam memperluas pewarnaan imunohistokimia. Pemeriksaan imunohistokimia banyak digunakan dalam dunia kedokteraan saat ini untuk menentukan diagnosis penyakit dan menentukan nilai terapi dari biomarker. Salah satu pengecatan imunohistokimia adalah Estrogen reseptor. Penggunaan *buffer sitrat* pada proses antigen retrieval dapat diganti dengan Tris EDTA. Tujuan penelitian mengetahui gambaran hasil pengecatan ER menggunakan Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 dan analisis perbedaan. Penelitian secara eksperimental dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian menggunakan jaringan kanker payudara ER positif skor +3 dari satu pasien. Metode pengecatan ER menggunakan teknik *Strep Avidin Biotin Complex*. Pengecatan ER menggunakan Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 dan *buffer sitrat* sebagai kontrol. Hasil pengecatan ER menggunakan buffer sitrat skor +3, Tris EDTA pH 6 skor +2, Tris EDTA pH 7 dan pH 8 skor +3. Terdapat perbedaan yang bermakna antara buffer sitrat dengan Tris EDTA pH 6. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara *buffer sitrat* dengan pH 7, pH 8 dan pH 9. Tris EDTA pH 7, pH 8 dan pH 9 dapat digunakan sebagai pengganti *buffer sitrat* pada proses antigen retrieval pengecatan imunohistokimia Estrogen Reseptor.

Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan penyakit degeneratif yang mematikan urutan kedua setelah penyakit jantung. WHO melaporkan dari 11 juta kematian tiap tahun, 2,3 juta kematiannya disebabkan oleh kanker (Wulandari, 2008). Dalam dunia kesehatan kanker masih menjadi masalah yang besar. Jumlah penderita tumor/kanker di Indonesia sendiri memiliki sekitar 4,3 per 1000 penduduk. Kanker payudara termasuk kanker yang sering terjadi pada wanita dengan jumlah penderita 26 per seratus ribu (Wahyudi, 2010). Penderita kanker ditemukan hampir 70% dalam stadium lanjut yang dapat bereproduksi menjadi stadium kronis (Oemiati *et al*, 2011).

Kanker dapat didiagnosis dengan melakukan pengecatan

***Corresponding Author**
Wiwin Yuni Relawati
Program Studi DIV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang Indonesia 50273.
E-mail: wiwinyuni15@gmail.com

http://repository.unimus.ac.id

imunohistokimia. Imunohistokimia adalah teknik yang digunakan untuk menemukan keberadaan molekul atau berbagai jenis komponen yang terdapat pada sel-sel jaringan dengan prinsip antigen–antibodi (Apriliyanto, 2017). Pengecatan IHC termasuk rangkaian proses manual kompleks dan biasanya dilakukan oleh petugas yang ahli dan memiliki fokus yang tinggi (Prichard, 2014). Pemeriksaan IHC banyak digunakan dalam dunia kedokteraan saat ini untuk menentukan diagnosis penyakit dan menentukan nilai terapi dari biomarker (Walker, 2006). Salah satu pengecatan imunohistokimia adalah Estrogen reseptor (ER). Estrogen memiliki peranan penting dalam perkembangan, diferensiasi dan pada sistem reproduksi (Berry, 2008).

Estrogen receptor (ER) merupakan *ligan-activated transkripsion factor* yang tergolong reseptor hormon *superfamili the nuclear* dari molekul reseptor yang dapat mengikat 17 β-estradiol. Sampai sekarang terdapat 2 reseptor yang dikenal yaitu ERα dan ERβ. Kedua reseptor tersebut secara luas ditampilkan dalam jenis jaringan yang berbeda, namun terdapat beberapa perbedaan penting dalam pola ekspresinya. ERα bisa didapatkan pada sel kanker endometrium, payudara, stroma ovarium, dan hipotalamus. Protein ERβ ekspresinya terdapat dalam ginjal, otak, tulang, jantung, paru-paru, mukosa usus, prostat, dan sel endotel (Susilo, 2012). Ada banyak pelopor aktif yang mempraktikkan patologi IHC, karena menyadari kebutuhan untuk meningkatkan kemampuan IHC pada jaringan formalin fixed, parafin-embedded (FFPE). Sehingga bisa untuk mempertahankan ciri morfologi yang menjadi dasar histopatologi diagnostik (Shi dan Taylor, 2010).

Saat ini antigen retrieval sering diterapkan pada arsip "blok parafin" untuk IHC dalam patologi bedah diagnostik sebagai prosedur rutin (Shi dan Taylor, 2010). Sejumlah faktor berkontribusi terhadap dampak utama antigen retrival terhadap patologi diagnostik (Shi dan Taylor, 2010). Proses antigen retrieval bertujuan untuk mengembalikan komponen protein/antigen yang tertutup pada saat proses fiksasi (Dabbs, 2013). Metode antigen retrieval yang digunakan dalam pengecatan IHC adalah metode *Protease-induced epitope retrieval* (PIER) dan metode *heat-induced epitope retrieval* (HIER). metode HIER memiliki efek yang baik untuk membantu memunculkan kembali epitop atau dalam hal mendeteksian antigen pada preparat yang tertutup pada proses fiksasi. Buffer penyangga yang sering digunakan dalam proses HIER seperti buffer sitrat, biasanya slide preparat direndam pada larutan tersebut dan dipanaskan dengan suhu dan waktu tertentu yang baik dengan cara di *microwave, boiling, steamer, waterbath, incubator* dan sebagainya (Ramos-Vara, 2005). Terdapat beberapa larutan yang bisa digunakan dalam proses antigen retrieval adalah sodium citrat, EDTA, Tris, urea, sukrosa, dan larutan komersial yang disediakan oleh kit (Platero, 2009). Tris EDTA Buffer adalah campuran antara larutan Tris-HCl dengan EDTA pada konsentrasi tertentu. Tris EDTA Buffer dalam praktikum biologi molekuler berfungsi untuk menstabilkan DNA dan RNA karena pH nya sekitar 8. Karena DNA dan RNA memiliki sifat asam lemah yang dalam waktu lama dapat menyebabkan degradasi DNA/RNA, sehingga dibuatlah TE Buffer tersebut (Fatmawati, 2015).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gambaran hasil pengecatan imunohistokimia Estrogen Reseptor menggunakan Tris EDTA dengan variasi pH sebagai antigen retrieval.

http://repository.unimus.ac.id

Bahan dan Metode

Jenis penelitian ini adalah eksperimen. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu penggunaan Tris EDTA pH 6, pH 7 pH 8 dan pH 9 sebagai antigen retrieval. Tempat penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Prof. Margono Soekarjo Purwokerto. Sampel penelitian ini adalah jaringan payudara yang di terdapat di RSUD Prof. Margono Soekarjo Purwokerto. Untuk setiap perlakuan, pengulangan yang dilakukan adalah sebanyak 6 kali.

Untuk kontrol menggunakan buffer sitrat sebanyak 6 preparat, sehingga pada penelitian ini di butuhkan sebanyak 30 preparat.

Variabel penelitian menggunakan variabel bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan Tris EDTA pH 6, pH 7 pH 8 dan pH 9 sebagai antigen retrieval. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi Estrogen Reseptor dari jaringan kanker payudara dengan pengecatan IHC.

Bahan yang digunakan adalah Entelan, xylene, ethanol, aquades, antigen retrieval (Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9), larutan PBS, H2O2 3%, normal serum, antibodi primer ER Biocare medical, antibodi sekunder (Trekkie Universal Link), Trekk avidin HRP, kromogen DAB, dan hematoxylin. Pengolahan jaringan di Fiksasi dengan buffer formalin 10%, dehidrasi dengan alkohol bertingkat, clearing dengan lilin formalin, impregnasi jaringan, dan penanaman jaringan ke dalam parafin (*embeding*). Proses pemotongan Jaringan disiapkan waterbath yang berisi aquades dengan suhu 600C, pastikan mikrotom pada posisi rata dan meja tidak goyang, blok di pasang, pasang pisau mikrotom pada tempatnya, atur kesesuaian jarak blok dengan pisau, putar mikrotom searah jarum jam dengan perlahan, amati irisan jaringan dengan ketebalan 3-4 mikron, setelah didapatkan irisan jaringan (pita-pita blok parafin) letakkan pada waterbath, siapkan objek gelas berikan identitas pasien, ambil jaringan menggunakan objek gelas yang sesuai identitas, keringkan sediaan atau preparat pada hotplate.

Pengecatan jaringan dengan Imunohistokimia Estrogen Reseptor, Proses Deparafinisasi : Sediaan jaringan direndam dalam xylene 1, xylene II, xylene III masing-masing 5 menit, rehidrasi sediaan jaringan dengan ethanol 100% : rendam selama 5 menit, ethanol 90% : rendam selama 5 menit, ethanol 70% : rendam selama 3 menit, sediaan jaringan direndam dengan air mengalir selama 5 menit.

Proses Antigen retrieval : Sediaan jaringan dimasukkan ke dalam (Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9) dipanaskan dalam microwave suhu 100°C selama 4 menit dan suhu 900 C selama 20 menit. 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, lalu rendam dengan air selama 2 menit.

Proses endogenous blocking : Sediaan jaringan dimasukkan ke dalam H2O2 3% dalam metanol selama 5 menit. Sediaan jaringan diangkat dan dibilas dengan air selama 5 menit. Air yang terdapat di sekitar jaringan dilap menggunakan tisu. Setelah itu blocking terhadap ikatan non spesifik dilakukan menggunakan blocking agent dengan normal serum selama 5 menit pada suhu ruang, bilas PBS, PBS di buang tanpa di cuci, langkah selanjutnya adalah tetesi antibodi primer ER selama semalaman pada suhu ruang (dalam keadaan lembab). Sediaan dicuci dengan PBS selama 10 menit dan dilap dengan tisu, kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (Trekkie universal link) selama 30 menit. Pencucian kembali dilakukan

http://repository.unimus.ac.id

dengan PBS selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan Trek avidin HRP selama 5 menit. Sediaan kembali dicuci dengan PBS selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan DAB kromogen selama 5-10 menit pada tempat gelap. Sediaan direndam dalam aquades I dan II selama masing-masing 5 menit.

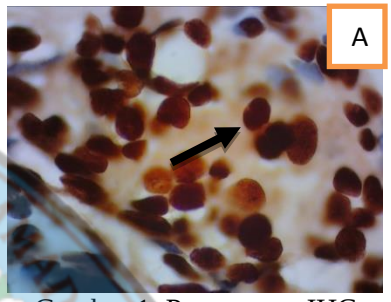
Counterstain dilakukan dengan menggenangi sediaan menggunakan hematoxylin selama 5 menit, kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit. Dehidrasi (Ethanol 70%, 90%, 100%) masing-masing 5 menit, clearing dengan Xylene I, Xylene II, Xylene III masing-masing 5 menit, lalu dilakukan mounting dengan entelan tutup dengan deck glass untuk diperiksa, amati dengan mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pembacaan hasil pengecatan IHC ER pada mikroskop dengan perbesaran 400 x sebanyak 100 sel. Intensitas yang didapat selanjutnya dicocokkan dengan Interpretasi hasil pengecatan IHC ER (AJCP, 2013 "dalam" Upadana dan Artha, 2014) sehingga menghasilkan suatu data. Data yang didapat selanjutnya dikumpulkan dan dicatat. 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. Data dilakukan uji normalitas dengan menggunakan saphiro wilk, apabila datanya normal menggunakan anova sedangkan jika data tidak normal menggunakan *uji Kruskal-Wallis.*

Hasil

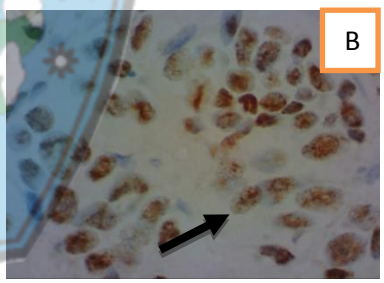
Hasil pengamatan dari pengecatan IHC dengan menggunakan buffer sitrat sebagai kontrol dan Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8 dan pH 9 dapat dilihat sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil pengamatan pengecatan IHC berdasarkan ekspresi ER

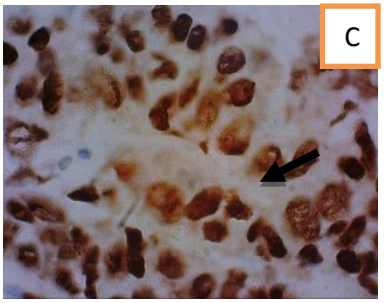
Antigen Retrieval	Penilaian ekspresi ER					
	1	2	3	4	5	6
Buffer Sitrat	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Tris EDTA pH 6	+2	+2	+2	+2	+2	+2
Tris EDTA pH 7	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Tris EDTA pH 8	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Tris EDTA pH 9	+3	+3	+3	+3	+3	+3



Gambar 1. Pengecatan IHC menggunakan buffer sitrat sebagai kontrol dengan perbesaran 400x.

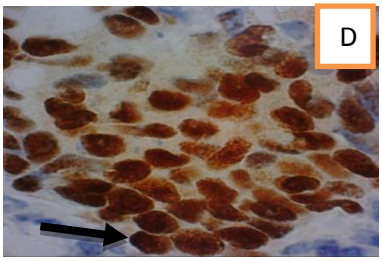


Gambar 2. Pengecatan IHC menggunakan Tris EDTA pH 6 dengan perbesaran 400x.

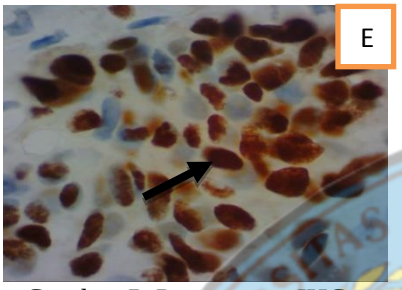


Gambar 3. Pengecatan IHC menggunakan Tris EDTA pH 7 dengan perbesaran 400x.

http://repository.unimus.ac.id



Gambar 4. Pengecatan IHC menggunakan Tris EDTA pH 8 dengan perbesaran 400x.



Gambar 5. Pengecatan IHC menggunakan Tris EDTA pH 8 dengan perbesaran 400x.

Hasil uji statistik dengan uji normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data penelitian terdistribusi normal, didapatkan bahwa nilai signifikansi = 0,000 yang berada dibawah taraf signifikansi (0,05) yang artinya data penelitian berdistribusi tidak normal dari hasil pengecatan imunohistokimia ER menggunakan buffer sitrat dan Tris EDTA.

Uji statistik dilanjutkan dengan uji kruskal wallis untuk menyatakan ada tidaknya perbedaan antar perlakuan, intensitas pengecatan immunohistokimia menggunakan buffer sitrat, dan Tris EDTA didapatkan bahwa nilai signifikansi = 0,000 yang berada dibawah taraf signifikansi (0.05) maka Ho ditolak yang artinya terdapat perbedaan antar perlakuan, intensitas ER yang dihasilkan dari pengecatan immunihistokimia terhadap buffer sitrat dan Tris EDTA.

Diskusi

Hasil penelitian diatas dapat dilihat bahwa pada pengecatan IHC menggunakan Tris EDTA pH 6 telah terjadi penurunan skor intensitas ER (+2) apabila dibandingkan dengan kontrol yaitu menggunakan buffer sitrat (+3). Tris EDTA pH 7, pH 8, pH 9 dapat menghasilkan skor intensitas ER (+3) yang sama dengan buffer sitrat sebagai kontrol. Prinsip dari metode imunohistokimia adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim hidrogen peroxidase dengan DAB. DAB merupakan cromogen yang bersifat basa sehingga menimbulkan warna coklat pada inti sel (Irawan, 2015). Skor intensitas yang rendah dan tinggi dikarenakan epitop (area molekul tertentu pada antigenik, seperti protein). Protein merupakan stuktur dari asam amino. Asam amino adalah senyawa organik yang memiliki gugus fungsional karboksil. Gugus karboksil yang dapat memberikan sifat asam, maka dari sifat asam tersebut dapat menarik zat yang bersifat basa sehingga pada pH 7, pH 8 dan pH 9 inti lebih banyak teroptimalisasi, sedangkan pada pH 6 inti kurang teroptimalisasi karena pH 6 sifatnya sudah asam (Welly *et al*, 2010). Buffer Tris EDTA adalah campuran antara larutan Tris-HCl dengan EDTA. Tris EDTA digunakan sebagai antigen retrieval yang bertujuan untuk memperbaiki pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk memunculkan kembali epitop dengan mengembalikan struktur protein atau antigen yang tertutup pada saat proses fiksasi (Ramos-Vara, 2005).

Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

http://repository.unimus.ac.id

1. Hasil pengujian menunjukkan bahwa terdapat skor IHC yang diperoleh dari pemberian perlakuan Tris EDTA pH 6 (skor +2) dan pH 7, pH 8 dan pH 9 (skor +3) maupun dengan buffer sitrat sebagai kontrol.
2. Tris EDTA pH 7, pH 8 dan pH 9 tidak berbeda dengan buffer Sitrat dalam pengecatan IHC. Tris EDTA pH 7, pH 8, dan pH 9 dapat digunakan sebagai pengganti buffer sitrat pada proses antigen retrieval pengecatan imunohistokimia ER.

Berkaitan dengan hasil penelitian ini maka saran-saran yang dapat diberikan adalah sebagai berikut: Antigen retrieval pada pengecatan IHC ER dapat menggunakan Tris EDTA dengan pH basa. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan mengganti penggunaan buffer sitrat pada proses antigen retrieval dengan bahan pengganti lainnya. Selain itu penelitian juga dapat dilakukan dengan pengecatan IHC lainnya selain ER sehingga lebih bervariasi.

Referensi

Apriliyanto B.T, 2017. Pengecatan Immunohistokimia Her2 Menggunakan Gelatin Sebagai Blocking Protein. skripsi.

Berry, N. B., 2008, Regulation of Estrogen Receptor-aphaz Ubiquitibnation and Proteasomemediated Receptor Degradation. *PrQuest, Champaign, pp.3-5.*

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.*

Fatmawati, 2015. Perbandingan Kualitas DNA Dengan Menggunakan Metode Boom Original Dan Boom Modifikasi Pada Isolat Mycobacterium Tuberculosis 151. *Jurnal Kimia 9 (1) : 41-46.*

Irawan. V, IHC Part 1: Antibody & Antigen, Fiksasi, Antigen Retrieval (AR), Endogenus Biotin, Endogenus Peroxidase. http://vetsciencereview.blogspot.co.id/2015/09/ihc-part-1 antibodyantigen fiksasi.html, 26 September 2015 (diakses 29 Oktober 2016).

Oemiati R, Rahajeng, E. & Kristanto, A.Y., 2011. *Prevalensi Tumor Dan Beberapa Faktor Yang Mempengaruhinya Di Indonesia.* Buletin Penelitian Kesehatan, 39(4), pp.190–204.

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.

Ramos-Vara, J.A., 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet. Pathol., 42:405–426.*

Shi dan Taylor, 2010. Antigen Retrieval Immunohistochemistry: Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry 59(1) 13–32*

Susilo, 2012. Ekspresi Protein ER (Estrogen Receptor) Pada Kanker Payudara Derajat Keganasan Baik, Sedang Dan Buruk. *Jurnal Ners 7 (1) : 88–93.*

Wahyudi Rahmat. 2016. *Gambaran konsep diri pasien kanker di RSUD. Prof. Dr. Margono Soekarjo Purwokerto tahun 2016.* Skripsi. http://repository.ump.ac.id/1984

http://repository.unimus.ac.id

/1/RAHMAT%20WAHYUDI%20BAB%20I.pdf.
Walker RA. 2006. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods utility and semiquantitative assassment. Histophatology 49: 406-10.
Welly Naga S, Adiguna B, Retnoningtyas E.S & Ayucitra A., 2010. Koagulasi Protein Dari Ekstrak Biji Kecipir Dengan Metode Pemanasan. *Widya Teknik 9, No. 1, 2010 (1-11*)
Wulandari, RD. 2008. *Genetika Kanker*. Jurnal UWKS 2(1).

http://repository.unimus.ac.id