



**AIR LIUR PAGI SEBAGAI BLOCKING PROTEIN
PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA KANKER PAYUDARA
METODE ER**



Idha Susilaningsih

G0C017051

**PROGRAM STUDI D-III ANALIS KESEHATAN
FAKULTAS ILMU KEPERAWATAN DAN KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SEMARANG
2020**

PERNYATAAN PERSETUJUAN

Manuscript dengan judul

**AIR LIUR PAGI SEBAGAI BLOCKING PROTEIN
PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA KANKER PAYUDARA
METODE ER**

Telah diperiksa dan disetujui untuk dipublikasikan

Semarang, 14 September 2020

**Idha Susilaningih
G0C017051**

Telah disetujui oleh:

Pembimbing



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

**SURAT PERNYATAAN
PUBLIKASI KARYA TULIS ILMIAH**

Yang bertanda tangan dibawah ini, saya :

Nama : Idha Susilaningsih
Nim : GOC017051
Fakultas/Jurusan : FIKKES / D-III Analis Kesehatan
Jenis Penelitian : Karya Tulis Ilmiah
Judul : Air Liur Pagi Sebagai Blocking Protein Pengecatan
Imunohistokimia Kanker Payudara Metode ER
Email : idhasusila1998@gmail.com

Dengan ini menyatakan bahwa saya menyetujui untuk :

1. Memberikan hak bebas royalti kepada Perpustakaan Unimus atau penulisan karya tulis ilmiah saya, dan pengembangan ilmu pengetahuan
2. Memberikan hak menyimpan, mengalih mediakan/mengalih formatkan, mengola 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 tulis ilmiah ini.

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

Semarang, 20 September 2020

Yang Menyatakan



(Idha Susilaningsih)

AIR LIUR PAGI SEBAGAI BLOCKING PROTEIN PENGECATAN IMUNOHISTOKIMIA KANKER PAYUDARA METODE ER

Idha Susilaningsih¹, Sri Sinto Dewi², Stalis Norma Ethica²

¹Program Studi D3 Teknologi Laboratorium Medik, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Semarang
Email : Idhasusila1998@gmail.com

²Laboratorium Mikrobiologi dan Sitohistoteknologi, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan
Universitas Muhammadiyah Semarang
Email : Sintomun@yahoo.com

Abstrak

Air liur pagi merupakan salah satu sumber protein di dalam mulut yang berbentuk enzim disebut juga lisozim. Air liur pagi kurang dapat dijadikan blocking agent yang berfungsi mengikat protein non spesifik yang terdapat dalam jaringan. Pencegahan diagnosis kanker payudara salah satunya dengan pengecatan IHC ER (Estrogen Reseptor), ER merupakan protein yang dihasilkan oleh jaringan yang mengalami mutasi gen pada DNA yang mengakibatkan terjadinya proliferasi sel. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui gambaran hasil pengecatan ER menggunakan air liur pagi 10%, 20% dan 30% sebagai blocking agent dengan normal serum sebagai kontrol. Sampel penelitian adalah blok parafin jaringan kanker payudara IHC ER +3. Pengecatan IHC secara indirect dengan metode strep (Avidin) Biotin Complex. Pengecatan IHC ER dengan normal serum didapatkan hasil +1. Konsentrasi paling baik pada pengecatan IHC ER menggunakan air liur pagi belum ditemukan.

Kata kunci : IHC, ER, Air liur pagi

Abstract

Morning saliva is a source of protein in the mouth in the form of an enzyme called lysozyme. Inadequate morning saliva can be used as a blocking agent which functions to bind non-specific proteins contained in the tissue. One of the diagnoses of breast cancer is by staining IHC ER (Estrogen Receptor), ER is a protein produced by tissue that has mutated genes in DNA which results in cell proliferation. The purpose of this study was to describe the results of ER staining using 10%, 20% and 30% morning saliva as a blocking agent with normal serum as a control. The study sample was a block of paraffin breast cancer tissue IHC ER +3. Indirect IHC staining with the strep (Avidin) Biotin Complex method. Normal serum IHC ER staining was +1. The best concentration in IHC ER staining using morning saliva has not been found.

Key words: IHC; ER; morning

1. Pendahuluan

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Karsinoma endometrium merupakan tumor ganas organ reproduksi wanita yang paling sering dijumpai, dengan insidennya yang terus meningkat, terutama pada wanita-wanita *postmenopause* di negara-negara berkembang. Estrogen akan menstimulasi pertumbuhan sel-sel endometrium menjadi karsinoma endometrium, sedangkan progesteron akan bertindak sebagai penghalangnya. Mekanisme kerja estrogen sebagai promotor langsung dalam karsinogenesis endometrium ini diperantarai oleh reseptor yang terdapat dalam jaringan endometrium. Beberapa parameter histopatologi seperti tipe histopatologi, *grading* histopatologi, invasi miometrium, invasi limfovaskular, dan *stage* tumor mempengaruhi ekspresi ER. Menurut beberapa penelitian, ER akan terekspresi pada tumor-tumor yang *low grade* (biasanya tipe *endometrioid grade* 1 dan 2), tanpa dijumpai invasi miometrium dan limfovaskular, sehingga dapat dikatakan bahwa ekspresi dari reseptor-reseptor ini dihubungkan dengan faktor prognostik yang baik. Oleh karena itu, maka kesempatan ini akan dilakukan penelitian untuk

menganalisis ekspresi ER. (Causa *et al*, 2017)

IHC (Imunohistokimia) merupakan suatu proses untuk menentukan letak atau lokasi dan jenis protein (antigen) yang berada di dalam sel-sel jaringan (Hastuti dan Lubis 2011). Prinsip dari IHC adalah perpaduan antara reaksi imunologi dan kimiawi, dimana reaksi imunologi ditandai dengan adanya reaksi antara antibodi dan antigen, sedangkan reaksi kimiawi ditandai dengan adanya reaksi antara enzim dan substrat (Sudiana, 2005)

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 meningkatkan protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibodi.

Cara yang paling efektif untuk meminimalisir pewarnaan nonspesifik adalah dengan menambahkan larutan protein (Bancroft dan Gamble, 2008). Beberapa *blocking agent* untuk *protein blocking* menurut Radig (2013), yaitu *normal serum* dan *protein solution*. *Protein solution* yang biasanya digunakan adalah *bovine serum albumin* (BSA) 0,1-0,5%, gelatin, susu skim, dan air liur pagi. Saliva merupakan cairan

eksokrin yang dikeluarkan ke dalam rongga mulut melalui kelenjar saliva. Komposisi saliva terdiri dari 94,0%-99,5% air, bahan organik dan anorganik. Komponen anorganik saliva antara lain Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} . Sedangkan komponen organik utama adalah protein, selain itu juga ditemukan lipida, glukosa, asam amino, ureum, amoniak dan vitamin3. Protein pada air liur terdapat di enzim lisozim, Lisozim bisa didapat dari berbagai sumber bahan pangan dan kandungan masing-masing berbeda (Belitz, *et al.*, 2009). Lisozim merupakan protein globular, kira-kira berukuran 14,4 kDa. Molekul enzim merupakan kompleks padat di dalam bentuk yang sama pada senyawa yang berbentuk *ellips* dengan protein lain dan dimensi berukuran 4,5 x 3,0 x 3,0 nm (Lesnierowski, 2003). Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui kemampuan air liur pagi sebagai protein blocking pada pengecatan IHC ER, mengetahui perbandingan gambaran hasil

pengecatan IHC ER dengan normal serum dan air liur pagi konsentrasi 10%, 20% dan 30%

2. METODE

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental.

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang. Variabel terikat dari penelitian ini yaitu hasil pengecatan imunohistokimia ER. Variabel bebas dari penelitian ini yaitu air liur pagi sebagai pengganti *normal serum* pada pengecatan imunohistokimia ER.

Hasil pengecatan dilihat dari intensitasnya yang diberi skor 0, +1, +2, dan +3 dengan kriteria penilaian yang mengacu pada ER/PR pharmDx™ Interpretation Manual.

Tabel 1. Interpretasi hasil pengecatan IHC ER.

skor	Penilaian
0	Intensitas pewarnaan pada ini nyaris tidak terlihat dari sel yang terwarnai
1	Intensitas pewarnaan pada inti terlihat samar
2	Intensitas pewarnaan pada inti tampak tidak menyeluruh (utuh) atau bersifat lemah
3	Intensitas pewarnaan pada inti tampak menyeluruh (utuh atau bersifat kuat)

Obyek Penelitian/ Populasi dan Sampel

Sampel dari penelitian ini adalah semua jaringan kanker payudara yang terdapat pada ruma sakit Elizabeth Semarang.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan untuk penelitian yaitu pipet, mikropipet, microwave, stranning jar, oven, neraca analitik, bekkor glass, objek glass, deckglass, dan gelas ukur. Bahan yang digunakan yaitu Xylol, Alkohol absolute (96%, 80%, 70%, 50%), aquades, buffer sitrat, H₂O₂ 3%, PBS, normal serum, air liur pagi konsentrasi 10%, 20% dan 30%, antibodi primer ER, antibodi sekunder, *Trekkie avidin HRP*, Kromogen DAB, hematoxylin.

Prosedur Penelitian

a. Pengambilan protein air liur pagi

Air liur pagi yang sudah ditampung pada wadah disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm, lalu supernatan diambil sebanyak 10 ml.

b. Tahap pengolahan jaringan

Jaringan yang telah dipotong dimatangkan dengan tahap awal fiksasi menggunakan alkohol atau disebut juga fiksasi alkohol. Tahap selanjutnya dehidrasi untuk menghilangkan air yang terdapat pada jaringan, pada tahap dehidrasi menggunakan larutan alkohol dengan cara direndam. Tahap penanaman jaringan pada *base mold*. Jaringan diambil dari kaset dan ditempatkan

pada *base mold*, kemudian dituangkan parafin cair yang sejenis dengan paraffin yang digunakan pada proses infiltrasi. Tahap yang penting di dalam proses ini adalah mengorientasikan jaringan secara baik sehingga dapat mempermudah proses pemotongan jaringan. Setelah blocking jaringan dengan parafin yaitu pemotongan jaringan dengan ketebalan 2 μ m. Alat yang digunakan untuk memotong mikrotomi, lalu hasil potongan yang berbentuk pita diletakkan pada waterbath dengan suhu 37°C, kemudian pita jaringan diletakkan pada objek glas khusus yaitu poliglisin tahap ini disebut dengan afiksing.

c. Pengecatan IHC ER

Deparafinisasi dengan larutan xylol 1, xylol 2, xylol 3 masing-masing selama 5 menit sebanyak 3 kali, kemudian rehidrasi dengan alkohol absolut bertingkat dari 96%, 80%, 70% dan 50% masing-masing selama 3 menit. Kemudian sediaan jaringan dicuci dengan aquadest selama 3 menit dan dilakukan proses *endogenous blocking* dengan larutan H₂O₂ 3% dalam metanol selama 5 menit. Sediaan jaringan dicuci dengan air mengalir selama 3 menit lalu direndam dalam aquadest selama 3 menit. Selanjutnya proses antigen retrieval dilakukan dengan memasukkan sediaan jaringan ke dalam larutan buffer sitrat dan dipanaskan dalam microwave dengan suhu 100°C dan dilanjutkan suhu 90°C masing-masing selama 5 menit.

Sediaan jaringan dikeluarkan dari dalam microwave biarkan selama 15 menit tunggu hingga beerglass dingin. Sediaan jaringan dicuci dengan buffer pH 7,4 selama 3 menit lalu direndam dalam H₂O₂ 3% selama 20 menit. bilas dengan cara ditetesi dengan buffer pH 7,4 selama 5 menit, sisa air disekitar jaringan dilap dengan tisu. Selanjutnya proses *protein blocking* terdapat ikatan non spesifik dilakukan menggunakan *blocking agent normal serum* dan air liur pagi konsentrasi 10% 20% dan 30% selama 15 menit pada suhu ruang. Tahap selanjutnya dilakukan inkubasi antibodi primer ER pengenceran 1:100 selama semalaman pada suhu kulkas. Kemudian sediaan dicuci dengan PBS dengan cara ditetesi selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan antibodi sekunder (*Trekki universal link*) selama 20 menit. Sediaan dicuci kembali dengan PBS selama 10 menit, lalu diinkubasi dengan Trek avidin HRP selama 10 menit.

Sediaan dicuci lagi dengan PBS selama 10 menit, kemudian diinkubasi dengan DAB kromogen selama 10 menit pada tempat gelap. Sediaan dibilas dengan PBS selama 10 menit. Pengecatan banding (*counterstain*) dilakukan dengan menggenangi sediaan dengan larutan hematoxylin selama 5 menit, lalu dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Sediaan jaringan direndam dalam PBS pH 7,4 selama 3 menit dan alkohol absolut 70%, 80%, dan 96% masing-masing selama 3 menit. *Clearing* menggunakan xylol 1, xylol 2, dan xylol 3 selama 3 menit, terakhir dilakukan *mounting* dengan entelan untuk diperiksa dibawah mikroskop perbesaran 400.

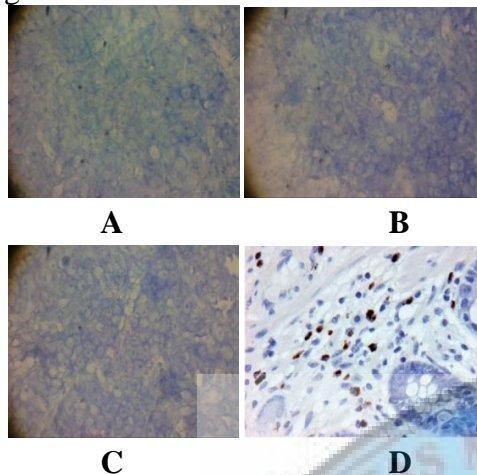
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Distribusi eksperimen ER berdasarkan intensitasnya terhadap empat sediaan dengan air liur pagi konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dan dua sediaan kontrol dengan normal serum dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. Hasil rata-rata pengamatan pengecatan IHC berdasarkan metode ER

Blocking agent	Penilaian ekspresi ER			
	1	2	3	4
A. Air liur pagi 10%	0	0	0	0
B. Air liur pagi 20%	0	0	0	0
C. Air liur pagi 30%	0	0	0	0
D. Normal serum	+1	+1		

Perbedaan hasil intensitas warna pada pengecatan IHC dengan variasi konsentrasi dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 1. Pengecatan IHC ER menggunakan *normal serum* (A), Air liur pagi 10% (B), Air liur pagi 20% (C), Ar liur pagi 30% (D) pada perbesaran 400 lensa obyektif.

PEMBAHASAN

America Society Clinical Oncology/Collage of America Pathologis belum memberikan patokan tentang blocking agent standar yang dapat digunakan saat proses *protein blocking* pada pemeriksaan IHC ER untuk kanker payudara. Beberapa referensi hanya menyebutkan bahwa diperlukan larutan protein untuk proses *protein blocking* hasil penelitian di atas dapat dilihat bahwa pada pengecatan IHC yang menggunakan air liur pagi 10%, 20%, dan 30% belum terjadi peningkatan intenitas warna 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 maupun nonspesifik dengan protein nonspesifik pada jaringan. Rendahnya konsentrasi protein yang terdapat dalam air liur pagi akan menurunkan kemampuannya berikatan dengan protein nonspesifik sehingga kemungkinan antibodi sekunder untuk berikatan dengan antibodi nonspesifik menjadi tinggi (Irawan, 2013).

Prinsip dari protein blocking ini adalah larutan protein (*blocking agent*) yang ditambahkan akan mengikat protein non spesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibodi primer. *Protein blocking* berperan dalam meminimalisir protein non spesifik yang berkompetisi dalam mengikat antibodi yang terdapat dalam jaringan (Bancroft & Gamble, 2008). Pengecatan IHC ER menggunakan air liur pagi dengan variasi konsentreasi 10%, 20%, dan 30% menunjukkan hasil intensitas warna yang sama, pada perlakuan air liur pagi dengan tiga konsentrasi diperoleh hasil pengecatan inti pada sel nyaris tidak terwarnai. Sehingga masih didapati perbedaan dengan

kontrol yang menggunakan normal serum.

4. SIMPULAN

Setelah dilakukan penelitian, dapat disimpulkan bahwa gambaran pengecatan IHC ER menggunakan air liur pagi 10%, 20% dan 30% didapatkan hasil sebagai berikut :

- a. Hasil pengecatan IHC ER pada protein blocking menggunakan air liur pagi 10% didapatkan hasil negative skor 0, konsentrasi 20% hasil negative dengan skor 0, dan konsentrasi 30% hasil negative skor 0.
- b. konsentrasi paling baik protein blocking pada air liur pagi belum ditemukan.
- c. Masih terdapat perbedaan supernatan dari air liur pagi 10%, 20% dan 30% dengan normal serum.

5. REFERENSI

Bancroft, J. D., dan Gamble, M. (Eds.). 2008. *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.

Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Eggs. In: Food Chem. Berlin (Germany): Springer; p. 546-562.

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. 2014. *Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*, in. elsevier.

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.

DAKO. 2015. KIT Inset ER/PR pharmDx™ Interpretation Manual.

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 2013 (diakses pada 16 juli 2016)

Lesnierowski, G., J. Kijowski, and J. Stangierski. 2003. DCS, SDSPAGE and Spectrophotometry for Charactization of Modified Lysozyme. *Electronic Journal of Polish Agric. Universities. J. Food Sci. and Tech.* 6.(1).

Masruro, Y. A. 2016. Pengecatan Imunohistokimia Her2 Menggunakan Susu Skim Dan *Normal Serum*.

Sudiana, I.K. 2005. *Teknonologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*. Jakarta, Universitas Airlangga.