

IMMUNO HISTOCHEMISTRY

P E M E R I K S A A N
IMUNOHISTOKIMIA

PROSEDUR DAN INDIKASI DIAGNOSIS

KK ~~A~~
KK

616.075 83

Als
P



Oleh :

Prof.Dr. Juliati Hood A.,dr,MS,SpPA,FIAC

Seksi Imunohistokimia LAB./SMF/INST.

Patologi Anatomi

F.K. Unair / RSUD Dr Soetomo Surabaya.

300 1800 00 3 111 ✓

DAFTAR ISI

	Hal
Daftar Isi	i
I. Pendahuluan	1
II. Tujuan	3
III. Dasar	8
IV. Batasan	8
V. Prosedur Tetap Pengiriman Bahan	9

PEMERIKSAAN IMMUNOHISTOKIMIA

I. Pendahuluan

Telah lebih dari 100 tahun lamanya ahli Patologi amat mengandalkan pemeriksaan mikroskop sinar dari irisan blok parafin dengan fiksasi formalin atau formaldehid untuk diagnosis histopatologi. Melalui pengalaman yang lama ini seorang ahli Patologi (surgical pathologist) mampu membuat interpretasi proses penyakit dengan cara mengenali pola dari sel-sel secara individual, susunannya dan hubungannya dengan sel sekitarnya. Kendala dari diagnosis morfologi ini adalah penentuan jenis kanker yang differensiasinya rendah atau tumor ganas anaplastik yang jumlahnya 60%. Kendala diagnosis ini timbul setelah bahan difiksasi dengan formalin dan diblok dengan parafin.

Interprestasi dari fungsi sel yang dapat dilihat melalui warna hasil pengecatan khusus inilah yang saat ini merupakan "gold standard" untuk menegakkan kebenaran dalam evaluasi diagnosis klinis suatu penyakit.

Pengenalan pola, susunan dengan permainan warna ini merupakan bagian utama dari diagnosis jaringan saat ini.

Immunohistokimia

Immunohistokimia merupakan prosedur yang relatif tidak mahal, tidak memerlukan alat dan ketrampilan dengan spesialisasi tinggi serta lebih cepat. metoda ini sekarang telah digunakan secara luas dinegara maju untuk Patologi bedah (surgical pathology) dan dapat memberi informasi penting dalam identifikasi kanker anaplastik, penentuan jenis leukemia dan lymphoma, identifikasi agen peradangan, hormon esse, hormon reseptor, "tumor growth fraction" dan oncogenes, yang terakhir ini sebagai pembantu penentu prognosis



kanker. Immunohistokimia dimulai tahun 1941, ketika Coon dkk berhasil melabel antibodi dengan fluorescein.

Selama 25 tahun immunofluorescence merupakan satu-satunya metode immunohisto (sito) kemistri dan walau menggunakan immunofluorescence secara langsung maupun tak langsung untuk berbagai aplikasi terutama dalam immunopatologi, ternyata tidak diterima luas untuk diagnosis rutin histopatologi dan sitologi karena dua alasan.

Yang pertama adalah karena gambaran morfologi secara rinci tidak jelas dan yang kedua preparat tidak dapat disimpan.

Pada tahun 1966 berkat terobosan Nakane, Piere dan Stemberger 1975, Immunohisto (sito) kemistri diterima sebagai prosedur rutin untuk diagnosis patologi dan sitologi. Sejak teknologi hibridoma diperkenalkan pada tahun 1975 oleh Kohler dan Milstein sampai sekarang telah diproduksi banyak antibodi monoklonal spesifik dan sensitif.

Di Inggris pada tahun 1990 dari sejumlah 30.000 pemeriksaan, 45% dari semua tumor, diperiksa immunohistokimistri, 53% untuk konfirmasi diagnosis histopatologi, untuk diagnosis definitif dari diagnosis banding sebanyak 14,4%, memberi sumbangan informasi yang bermanfaat sebanyak 18% dan tidak dapat memberikan informasi karena fiksasi kurang sempurna sebanyak 13,5% diagnosis yang tidak diduga sebanyak 1%.

Di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, metode Immunohisto (sito) kemistri telah dilakukan sejak tahun 1980 untuk kepentingan penelitian S3 kasus perkusus. Sejak tahun 1990 pemeriksaan immunohisto (sito) kemistri telah mulai lancar dan mulai menerima pemeriksaan dari luar khusus untuk kasus-kasus sulit.

Di Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya metode ini belum dilakukan, namun oleh karena rumah sakit Dr Soetomo adalah suatu rumah sakit akademis maka ini mutlak harus dilaksanakan.

Dari 90 kasus dengan undifferentiated malignant tumor tahun 1992 yang kami evaluasi secara immunohisto (sito) kemistri hasilnya sebagai berikut :

- 60% menentukan diagnosa definitif dari diagnosa banding
- 13,3% untuk konfirmasi diagnosis
- 13,3% memberi informasi yang bermanfaat
- 4,4% diagnosa yang tidak terduga
- 11,1% tidak dapat memberi informasi karena bahan tidak representatif

II. Tujuan

Aplikasi praktis Immunohisto (sito) kemistri dengan menggunakan antibodi monoklonal untuk diagnosis patologi tumor adalah untuk :

1. Klasifikasi Neoplasma

Klasifikasi ini menggunakan panel antibodi monoklonal yang terdiri atas sedemikian rupa sehingga positif dan negatif saling memperkuat untuk mencapai diagnosis definitif.

a. Analisa Tumor Sel Besar

Terdiri atas karsinoma anaplastik, lymphoma sel besar, melanoma amelanotik, antibodi monoklonal yang digunakan yaitu anti sitokeratin, anti vimentin, anti EMA, NKI/C3, anti LCA.

b. Analisa Tumor Sel Bulat

Terdiri atas Ewing Sarkoma, Neuroblastoma, Lymphoma Lymphoblastik, Embrionic Rhabdomyo Sarkoma. Antibodi monoklonal yang digunakan yaitu anti sitokeratin, anti-nerofilamen, anti desmin, anti LCA

c. Differensiasi Karsinoma Adeno Squamous

Dengan anti sitokeratin 18 dan 10

d. Diagnosa banding mesotelioma dan Adeno karsinoma Paru

Antibodi monoklonal yang digunakan adalah anti sitokeratin 5, CEA

e. Karakterisasi Sarkoma

Dengan anti desmin, anti faktor 8, anti GFAP, anti protein S 100

f. Immunophenotyping Lymphoma

2. Deteksi Sel Neoplasma

Misalnya deteksi sel tumor dalam jumlah kecil dalam kelenjar getah bening atau sumsum tulang misalnya sel tumor payudara atau sel leukemia.

3. Menentukan Lokalisasi Tumor primer

Permasalahan yang penting disini adalah Adeno Karsinoma.

Karsinoma jenis skuamus lebih peka terhadap radiasi dari sitostatika, tetapi Adeno Karsinoma terutama yang berasal dari saluran pencernaan, ginjal dan servik mempunyai reaksi yang jelek pada terapi tersebut.

Adeno karsinoma tiroid, payudara, ovarium dan prostat mempunyai respon dari sedang sampai baik. Kedua kelompok karsinoma ini harus dibedakan dengan baik. Karsinoma prostat dapat dideteksi dengan prostat spesifik antigen, tiroid dengan trioglobulin. Karsinoma nodulare tiroid dengan CEA dan calcitonin. yang sulit dibedakan adalah karsinoma kolon dan paru. Bila surfakan apo-protein positif berarti karsinoma tersebut berasal dari paru.

Jenis Antigen karsinoma dari Berbagai Asal

	C E A	OC 25	OV-TL3
Paru	+	-(+)	-
Payudara	+	+	-
Kolon	+	-	-
Ovarium	-(+)	+(-)	+
Endometrium	-(+)	+	-
Servik	-(+)	+	-

4. Pemeriksaan Immunohistokemistri lain yang penting dengan Antibodi Monoklonal Terhadap :

- Reseptor transferin yang terlibat pada mitosis
- Reseptor yang ada hubungannya dengan fungsi sel misalnya reseptor interleukin 2
- Faktor pertumbuhan (epidermis, derivat platelet) dan produk onkogen
- Reseptor yang ada hubungan dengan metatase (homing reseptor)
- Bahan dari membran basal.

Yaitu laminin dan kolagen II dan IV berperan untuk mengetahui mikroinvasi.

- Reseptor yang ada hubungan dengan terapi : estrogen, steroid. Untuk kanker paru, neuron spesifik enolase atau chromogranin atau petanda neuroendokrin 123 C3) bereaksi positif pada karsinoma sel kecil dan karsinoid. Petanda ini juga positif pada karsinoma yang lain dengan klinis yang agresif. Bila hasil menunjukkan reaksi positif, berarti sebaiknya diterapi sebagai karsinoma sel kecil. Membedakan karsinoma sel kecil dengan tumor karsinoid menggunakan reseptor transferin yang

berperan pada mitosis, karena akan bereaksi negatif pada karsinoid.

Dengan makin banyak tersedianya antibodi monoklonal yang reaksi pada antigen lekosit dan sub populasi lekosit, telah dimungkinkan diagnosis dan subklasifikasi dari lymphoma maligna yang lebih dipercaya dan lebih cepat. Reproduksi klasifikasi dari lymphoma Non Hodgkin naik dengan pesat secara bermakna dari 60-70% sampai hampir 100% bila digunakan immunophenotyping.

Untuk ahli Patologi bedah (surgical pathologist) immunophenotyping ini amat berguna dan kadang-kadang merupakan suatu keharusan, karena :

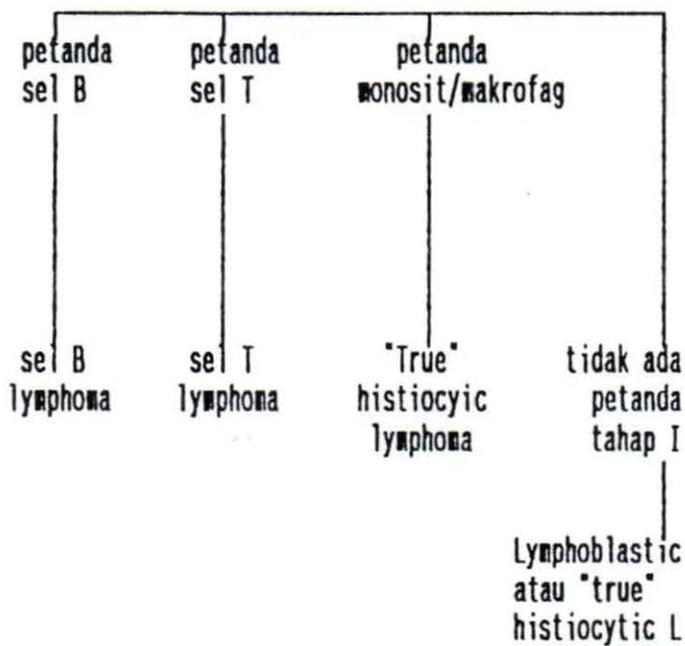
- differensi reaktif hiperplasia dari limfoma maligna
- differensiasi jenis tertentu dari Morbus Hodgkin yaitu jenis limfosit predominan dari limfoma sel kecil sel B
- memastikan "neoplastic cell line" untuk kepentingan prognosis dan terapi
- klasifikasi Non Hodgkin limfoma terutama bentuk diffus dan limfoma sel besar.

5. Immunophenotyping dari Lymphoma

1. Sel Reedsternberg positif pada lingkungan yang tepat ----> M.Hodgkin
2. Sel Reedsterberg negatif ----> Non Hodgkin L.

Immunophenotyping
tahap I

Tahap II (subtyping)



Keterangan :

Subtyping NHL jenis T pada saat ini belum mutlak diperlukan karena penderita dengan sel T lymphoma umumnya mempunyai prognosis yang jelek. Bila terapi dengan interferon akan diberikan pada penderita, subtyping lebih lanjut perlu dibuat, mengingat ada tidaknya reseptor lymphokine seperti interleukin 2 dapat meramal sukses tidaknya terapi. Adanya immunoglobulin sitoplasma yang monolitik (Cig) dan tidak ada komplemen (CRI) dapat membedakan lymphoma B immunoblastik dari sentroblastik. Lymphoma histiocytic dapat didiagnosis bila petanda sel T dan sel B negatif dan petanda histiosit positif. Untuk immunophetyping infiltrat limfosit histiosit pada kulit perlu menggunakan petanda proliferasi Ki 67. Bila reaksi positif pada infiltrat epidermis berarti Mycosis Fungoides dan positif pada limfosit dermis dan epidermis menandakan suatu Sindroma Sezary.

III. Dasar

Diagnosis akurat suatu tumor atau yang lain, mutlak diperlukan dengan gabungan antara gambaran morfologi dan fungsional pada bahan sitologi (sel) ataupun histopatologi (jaringan).

Dengan menggunakan bantuan petanda-petanda dari sel, jaringan atau bahan atau produk sel atau tumor maka akan dapat diperoleh diagnosis yang amat mendekati kenyataan.

Petanda-petanda ini sering berupa monoklonal / poliklonal antibodi yang sekarang telah banyak terdapat dipasaran.

Ada 4 metoda pemeriksaan yang kami gunakan yaitu :

1. Imunoperoxidase tak langsung 3 tahap (strep Ab complex HRP) untuk :
 - a. bahan parafin
 - b. bahan sitologi / fresh
2. Immunohistokimia tak langsung 3 tahap dengan microwave. Untuk bahan parafin.
3. LSAB 2 kit
4. Prosedur ABBOTT ER monoklonal

IV. Batasan

Pemeriksaan imunohistokimia adalah pemeriksaan imunokimia pada bahan histopatologi atau sitologi dengan menggunakan antibodi poliklonal atau monoklonal. Pemeriksaan ini diperlukan apabila hasil diagnosis pemeriksaan sitologi atau histopatologi :

- 1) belum tuntas
- 2) dalam diagnosa banding
- 3) meragukan
- 4) tidak sesuai dengan diagnosis klinik
- 5) tidak dapat menentukan
- 6) lihat tujuan

V. Prosedur Tetap Pengiriman Bahan

Cara Pengiriman Bahan

1. Bahan blok parafin
(tidak lebih dari 1 bulan)
2. Bahan sitologi / FNA
3. Bahan biopsi
4. Bahan segar

Fiksasi

Bahan yang baik adalah yang dikirim ke Laboratorium Imunohistokimia berupa bahan segar. Ini berlaku untuk tempat pengiriman yang dekat dengan laboratorium.

Bahan sitologi FNA atau biopsi sebaiknya difiksasi dengan alkohol 70%. Bahan segar dimasukkan ke dalam aluminium foil lalu dimasukkan dalam tempat atau termos dan diberi *dry ice*.

Untuk bahan parafin sebaiknya tidak lebih dari 1 bulan.

Lama Pemeriksaan

Bila tidak ada halangan (listrik mati, kasus sulit, hari libur) hasil akan selesai dalam 2 hari.

Biaya

Walaupun pemeriksaan imunohistokimia di seksi Imunohistokimia masih banyak untuk riset, namun kami menerima pemeriksaan dari RSUD Dr Soetomo Surabaya. Sehubungan dengan mahalnya antibodi dan masih merupakan pemeriksaan yang belum rutin maka tentunya biaya pemeriksaan akan lebih tinggi dari biaya patologi/sitologi.

Tempat Pemeriksaan

Sampai saat ini atau sejak tahun 1990 seksi imunohistokimia Laboratorium Patologi Anatomi menerima pemeriksaan imunohistokimia



di Fakultas Kedokteran. Sedangkan kami sedang berbenah untuk membuka pemeriksaan di Instalasi patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo Surabaya.

Prosedur Pemeriksaan.

A. Immunoperoxidase Tak langsung 3 Tahap.

Prosedur :

1. Diparafinisasi 5% dalam xylene (3 X)
Dehidrasi (3X 100%, 1X 96%, 1X80% alkohol)
2. a. Mengeluarkan pigmen inerkuri bila perlu ;
Sediaan masukkan dalam lugol (0,5% Jo didalam 70% alkohol)
Cuci 3 kali dengan aquadest, kemudian masukkan dalam 2,5% natrium - thiosulfat dan cuci 3 kali dengan aquadest.
b. - Diinkubasi di dalam 0,4% pepsin dalam 0,001 HCL untuk keratin dan faktor 8 selama 60 menit dalam suhu ruang 37^o C
- Diinkubasi dalam 0,1 % Ca Cl₂, pH 7,8 dengan 0,1 N Na OH selama 30 menit dalam suhu ruang 37^o C untuk intraseluler imunoglobulin
3. Dilakukan blok endogenous peroksidase jika perlu sediaan dimasukkan ke dalam larutan hydrogen peroksidase 0,3 dalam methonal, waktu 30 menit didalam suhu ruang
4. Sediaan dicuci 4 kali dengan PBS, setiap 5 menit diganti
5. Diinkubasi dengan yang bukan imun serum dengan pengenceran 1/5 selama 10 menit pada suhu ruang (jika perlu). Kemudian larutan dibuang begitu saja tidak perlu dicuci.
6. Sediaan ditetesi antibodi primer 60 menit dalam suhu ruang.
- Monoklonal antibodi diencerkan dengan PBS + BSA 0,5%
- Polyclonal antibodi diencerkan dengan PBS

kecuali intermediate filament protein, diencerkan sama dengan monoklonal antibodi.

7. Cuci 4 kali dengan PBS setiap 5 menit diganti
8. Sediaan ditetesi dengan antibodi sekunder selama 40 menit dalam suhu ruang.

Monoklonal antibodi dengan antibodi E 354

Poliklonal antibodi dengan antibodi E 353

9. Cuci 4 kali dengan PBS, setiap 5 menit diganti
10. Diinkubasi dengan strep AB complex selama 10 menit dalam suhu ruang.
11. Cuci 4 kali dengan PBS setiap 5 menit diganti
12. Dilakukan aktivitas peroksidase larutan DAB / AC selama 5 - 10 menit dalam suhu ruang
13. Dicuci 2 kali dengan aquadest
14. Dilakukan counter stain dengan Halmotoxylin Mayer selama 5 menit
15. Dicuci selama 10 menit dengan air mengalir
16. Kalau pakai AEC, langsung ditutup dengan aquamant, kemudian dilihat di mikroskop.
17. Kalau dipakai DAB, dilakukan dehidrasi dengan alkohol yaitu 1X 80%, 2X 96%, 3X 100%, 3 xylol.
Kemudian ditutup dengan entelan, dilihat dimikroskop.

Keterangan :

- Kalau pemeriksaan sitologi langsung dilakukan fiksasi dengan aceton selama 10 menit
- Kemudian dicuci dengan PBS 4 kali masing-masing selama 5 menit
- Langsung ditetesi antibodi primer selanjutnya sampai selesai seperti yang diatas.

B. Immunoperoxidase tak langsung 3 tahap dengan Microwave.

1. Sediaan parafin dilakukan dewax, yaitu xilol 3 kali kemudian alkohol 3 kali 100%, 1 kali 96%, 1 kali 80%
2. Dilakukan blok endogenous peroksidase dengan 0,5% H₂O₂ dalam methanol selama 30 menit, kemudian dimasukkan air sebentar.
3. Dicuci selama 1 menit dalam air mengalir, kemudian dimasukkan aquadest sebentar
4. Dilakukan tahap mikrowave dengan pemanasan selama 10 menit, menggunakan larutan 10 mm citrat buffer pH 6,0
5. Dilingkari dengan "PAP" pen (Dakopatts, cat, No. S 2002), kemudian dimasukkan dalam PBS pH 7,4 selama 5 menit.
6. Dilakukan bloking serum, dimasukkan dalam 3% normal horse serum selama 20 menit
7. Kemudian larutan bloking serum dibuang tidak perlu dicuci, ditetesi dengan primary antibodi yang sudah diencerkan dengan NHS, selama semalam dalam suhu ruang.
8. Dicuci PBS pH 7,4, 2 kali masing-masing 3 menit
9. Ditetesi dengan antibodi sekunder yang sudah diencerkan dengan NHS, diinkubasi selama 30 menit.
10. Dicuci PBS pH 7,4, masing-masing 2 kali selama 3 menit
11. Ditetesi dengan conjugated streptavidin yang sudah diencerkan 1/1500 dengan NHS selama 60 menit dalam suhu ruang
12. Dicuci PBS pH 7,4 masing-masing 2 kali selama 3 menit
13. Dimasukkan larutan substrat peroksidase 25 mg DAB ke dalam 50 ml Tris HCl pH 7,4 ditambah 50 µl H₂O₂ 30%, selama 15 - 20 menit.
14. Dicuci PBS pH 7,4 sebentar
15. Dimasukkan Conterstain dengan Mayer's Haematoksin
16. Dilakukan dehidrasi yaitu alkohol 1 kali 80%, 1 kali 96%, 3 kali 100%, kemudian xilol 3 kali

17. Ditutup dengan entelan dan gelas penutup lalu dilihat di mikroskop

C. Pemeriksaan LSAB 2 Kit

1. Sediaan parafin dilakukan dewak.

Sediaan sitologi difiksasi dengan aceton selama 10 menit

2. Sediaan dimasukkan Tris Buffer, kemudian ditetesi botol 1 yang berisi 3% hidrogen peroxide, diinkubasi selama 5 menit dalam suhu ruang.

Cuci dengan Tris buffer yang baru selama 2 menit

3. Sediaan ditetesi dengan primer antibodi, diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang.

Cuci dengan Tris buffer yang baru selama 2 menit

4. Sediaan ditetesi dengan larutan berwarna kuning (botol 2) yang berisi Biotinylated Secondary Antibodi, diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang.

Cuci dengan Tris buffer yang baru selama 2 menit

5. Sediaan ditetesi dengan larutan berwarna merah (botol 3) yang berisi strepavidin peroksidase Conjugate, diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang.

Cuci dengan Tris buffer yang baru selama 2 menit

6. Angkat dari Buffer

Ditetsi dengan larutan substrat chromogen, diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang, kemudian cuci dengan aquadest sebentar.

7. Dilakukan Counterstain selama 5 detik dengan Mayer Haematoksin, kemudian dimasukkan larutan Scott's bluing selama 30 detik, kemudian dimasukkan air.

8. Dilakukan mounting dengan media Dako Glycergel, code No. C563 dan gelas penutup.

Kemudian hasil dilihat di mikroskop.

D. Prosedur Abbott ER Monoklonal

- Persiapan :
- PBS 0,01 Mol untuk 1 minggu (Fresh)
 - Methanol Absolut (alkohol absolut)
 - Harris Hematoksillin 1%
 - Control Negatif
 - Adesive
 - Kontrol positif

Prosedur :

1. Sediaan parafin dilakukan dewak, kemudian dimasukkan larutan PBS selama 5 menit 2 kali dalam suhu ruang. Kalau jaringan sitologi langsung fiksasi aceton 10 menit, kemudian dimasukkan larutan PBS selama 5 menit 2 kali dalam suhu ruang.
2. Menghilangkan kelebihan PBS pada sediaan pemeriksaan dan sediaan kontrol
3. Reagen bloking diteteskan pada sediaan maupun kontrol
4. Diinkubasi selama 15 menit dalam Chamber
5. Kelebihan cairan bloking dibersihkan
6. Primer antibodi diteteskan pada sediaan dan cairan kontrol pada sediaan kontrol.
Inkubasi selama 30 menit pada Chamber
7. Masukkan dalam PBS selama 5 menit, dan ulangi dengan PBS baru
8. Dibersihkan dari PBS
9. Tetesi larutan Bridying antibodi, inkubasi selama 30 menit dalam Chamber
10. Masukkan dalam PBS selama 5 menit dan ulangi dengan PBS baru
11. Diulangi dengan PBS baru
12. Ditetesi larutan PAP complex baik sediaan maupun kontrol.
Inkubasi selama 30 menit pada Chamber
13. Masukkan dalam PBS selama 5 menit ulangi dengan PBS baru
14. Bersihkan dari PBS selama 10 - 15 menit.
Sebelum nomor 14 harus disiapkan larutan Chromogen Substrat.

Persiapan : tabung gas, pengaduk gelas/plastik, pipet semua harus bersih.

Cara : 1 tablet DAB dicampur dengan 5 cc substrat diaduk kemudian ditutup.

Larutan substrat hanya dapat dipakai selama 30 menit.

15. Teteskan larutan Chromogen ke semua slide (meliputi slide).
Inkubasi selama 5 - 7 menit
16. Menghilangkan kelebihan Chromogen dengan 100 cc air
17. Masukkan dalam staining jar berisi aquadest
18. Dialiri aquadest selama 5 - 6 menit

Conterstaining

19. Harris Hematoksin 1% Inkubasi 4 - 6 menit
20. Air mengalir 4 - 6 menit

Mounting

21. Alkohol absolut inkubasi selama 2 menit
22. Alkohol absolut inkubasi selama 2 menit
23. Xilol inkubasi selama 2 menit, ulangi dengan xilol baru selama 2 menit
24. Entelan, mounting dan gelas penutup
Ditunggu selama 10 menit untuk pemeriksaan mikroskop.



KEPUSTAKAAN :

- Leong ASY, A Kan, J Milios , 1989, Small round cell tumors in childhood, Surgical Pathology, Vol. 2, No. 1, p. 5-17
- Leong ASY, Bown AM, 1993. Immunohistochemistry of solid tumors. I and II. In : Applied Immunohistochemistry for the surgical pathologist (2 & 3)
- Meiyer CJLM, Muilink H, Henzen Logmans SC, 1989.
Practical of application of monoclonal antibodies in diagnostic tumor pathology. In : Application of monoclonal antibodies in tumour pathology, P. 299-311.
- Hood J, 1993. Role of immunohistochemistry in the diagnosis of 90 cases of undifferentiated malignant tumours.
Majalah Kedokteran Surabaya.
- Hood J, 1990. Neuroendocrine related antigen in lung cancer. Majalah IAPI, Vol. 3, no. 3-4, 1990.
- Hood J. The application of monoclonal antibodies in the diagnosis of tumour pathology. National Course and Workshop on Immunohistochemistry, Surabaya, Mei 1993.
- Hood J. Role of Immunohistochemistry in 335 cases of malignant tumors.
Fol.Med.Ind. April-June 1999 No. 2, page 35-37.