

KKU

PERAN PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA  
DI BIDANG KEDOKTERAN

KK

CLINICAL PATHOLOGY

616.07

Put

P

Oleh

Suhartono Taat Putra



0066849953111

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"  
SURABAYA

Fakultas Kedokteran  
Universitas Airlangga

1993



## I. PENDAHULUAN

Pada saat ini sudah banyak pemeriksaan imunopatologik, khususnya pemeriksaan imunohistokimia, yang digunakan di bidang kedokteran, baik pada pelayanan kesehatan maupun untuk penelitian di bidang kedokteran. Pemeriksaan ini memerlukan laboratorium yang relatif lebih lengkap dibanding dengan laboratorium untuk pemeriksaan rutin histopatologik dan sitologik. Peralatan tambahan yang diperlukan pada pemeriksaan imunopatologik terutama berkaitan dengan kebutuhan terhadap pemrosesan jaringan segar. Selain itu laboratorium demikian memerlukan beberapa reagen yang memerlukan penyimpanan khusus dan mempunyai masa aktif yang terbatas.

Di bidang pelayanan kesehatan, pemeriksaan imunopatologik banyak diperlukan untuk meningkatkan ketepatan diagnosis, evaluasi, pemantauan dan prognosis yang tidak dapat dilakukan oleh pemeriksaan rutin. Di bidang penelitian, pemeriksaan variabel imunopatologik, baik pemeriksaan imunohistokimia maupun imunositokimia banyak diperlukan, terutama pada penelitian yang menggunakan paradigma yang berkonsep imunopatologik.

Pemeriksaan imunopatologik ini antara lain, teknik pewarnaan peroksidase anti peroksidase, alkalinfosfatase anti alkalinfosfatase dan *Avidin Biotin Complex*. Teknik pewarnaan terakhir ini merupakan salah satu teknik pewarnaan untuk jaringan dan sel yang dianggap paling peka. Teknik tersebut dikembangkan dari teknik imunoperoxidase, dengan mengganti penggunaan label PAP, baik dengan substrat DAB atau substrat AEC, dengan label suatu kom-

pleks avidin-biotin. Pewarnaan ini banyak digunakan untuk pemeriksaan petanda tumor, maka pada materi ini pewarnaan imunoperoksidase dan ABC dikaitkan dengan penggunaannya untuk pewarnaan petanda tumor.

Di Indonesia perkembangan teknik laboratorium kesehatan berkembang dengan pesat. Perkembangan teknik tersebut disebabkan semakin meningkatnya tuntutan terhadap kualitas pelayanan kesehatan dan perkembangan konsep keilmuan yang digunakan dalam penelitian selama ini. Pelaksanaan pendidikan pascasarjana dan semakin besarnya perhatian pemerintah terhadap perkembangan penelitian di Indonesia, semakin mendorong perkembangan laboratorium kesehatan, khususnya laboratorium imunopatologik. Dengan semakin banyaknya pemanfaatan konsep imunopatologik, maka pewarnaan sediaan histopatologik dan sitologik, semakin memerlukan teknik pemeriksaan imunopatologik, seperti imunohistokimia dan imunositokimia.

Pada saat ini teknik imunohistokimia dan imunositokimia ini banyak digunakan, baik untuk mengungkap petanda kanker maupun mengungkap variabel lain, yang berkaitan dengan diagnosis dini, evaluasi, pemantauan atau yang berkaitan dengan prognosis, dan pemeriksaan variabel untuk pembuktian konsep dalam penelitian. Kedua teknik ini berdasar pada ikatan spesifik antara antibodi dengan antigennya. Keterikatannya diberikan indikator yang berupa enzim dan substratnya, yang dapat bereaksi dan berubah warna.

Di Laboratorium Patologi Anatomi, perkembangan teknik baru dalam pembuatan sediaan mikroskopik ini, banyak digunakan untuk menegakkan diagnosis kanker atau untuk memecahkan kasus diagnosis sukar yang tidak dapat diselesaikan dengan pewarnaan rutin, seperti hematoksilin eosin dan pewarnaan Papanicolaou. Hal demi-

kian dimungkinkan mengingat keberadaan petanda yang mempunyai nilai untuk meningkatkan kedinihan dan ketepatan diagnosis serta prognosis, dapat diwarnai oleh substrat yang berubah warna oleh reaksi enzimatik, dengan melalui ikatan antigen - antibodi yang spesifik. Pada kesempatan ini akan diketengahkan perihal pemanfaatan teknik laboratorium imunohistokimia dan imunositokimia pada berbagai pemeriksaan variabel imunopatologik.

## II. BATASAN

### 1. Pemeriksaan imunopatologik

Pemeriksaan imunopatologik merupakan pemeriksaan atas variabel yang mencerminkan konsep imunopatologik, yang selanjutnya disebut sebagai variabel imunopatologik, dengan menggunakan teknik pemeriksaan yang berdasar pada ikatan spesifik antigen antibodi.

### 2. Pemeriksaan imunohistologik

Pemeriksaan imunohistologik merupakan pemeriksaan atas variabel imunopatologik jaringan dengan menggunakan teknik pemeriksaan yang berdasar pada ikatan antigen antibodi.

### 3. Pemeriksaan imunositologik

Pemeriksaan imunositologik merupakan pemeriksaan atas variabel imunopatologik sel dengan menggunakan teknik pemeriksaan yang berdasar pada ikatan antigen antibodi.

### III. PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA DAN IMUNOSITOKIMIA

Pemeriksaan imunohistokimia dan pemeriksaan imunositokimia merupakan pemeriksaan imunopatologik. Kedua pemeriksaan tersebut merupakan pemeriksaan atas variabel yang mencerminkan konsep imunopatologik, yang selanjutnya disebut sebagai variabel imunopatologik. Pemeriksaan ini menggunakan teknik pewarnaan yang berdasar pada ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. Perkembangan teknik pemeriksaan ini mempunyai pengaruh timbal balik dengan perkembangan yang terjadi pada imunologi dan patobiologi. Selain teknik memerlukan kemajuan yang dicapai oleh perkembangan imunologi dan patobiologi, teknik ini juga telah memicu perkembangan kedua ilmu tersebut.

Pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia sangat potensial untuk memeriksa antigen secara lokal di jaringan dan di sel. Kedua pemeriksaan ini mempunyai kemampuan yang tinggi untuk memisah, seleksi dan bersifat spesifik, bila dibanding dengan pemeriksaan yang lain, seperti histokimia dan pemeriksaan rutin. Hal ini disebabkan karena kedua teknik pewarnaan imunopatologik tersebut berdasar pada ikatan spesifik antara antigen dengan antibodinya. Karena itu pemeriksaan tersebut banyak dimanfaatkan untuk meningkatkan kualitas diagnosis, memantau dan evaluasi hasil pengobatan serta memeriksa petanda yang bernilai sebagai prognostikator.

Selain kelebihan yang dimiliki oleh teknik pewarnaan imunohistokimia dan imunositokimia, ternyata teknik pewarnaan tersebut mempunyai beberapa penyulit. Untuk lebih memahami penyulit tersebut dan memikirkan cara untuk mengatasinya, maka perlu lebih dahulu diketengahkan elemen penting yang terkait dengan pemerik-

saan tersebut. Kedua pemeriksaan tersebut memerlukan perubahan elemen biologik yang bersifat mengganggu keseimbangan atau merupakan perubahan sebagai usaha untuk mengembalikan keseimbangan. Pemeriksaan imunopatologik ini memerlukan perubahan elemen patobiologik. Elemen inilah yang dapat digunakan sebagai petanda. Elemen patobiologik yang dapat diperiksa dengan teknik pemeriksaan imunopatologik adalah elemen yang bersifat imunogenik, atau dapat dibuat imunogenik atau dapat dideteksi oleh antibodi terhadap elemen atau kompleks yang terbentuk dari elemen tersebut. Dengan demikian maka adanya elemen demikian menjadi syarat penting untuk pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia.

Imunogen merupakan molekul yang mampu untuk merangsang timbulnya respons imun, sedang antigen adalah molekul yang dapat mengikat antibodinya secara spesifik. Dengan demikian maka semua imunogen adalah antigen, tetapi tidak semua antigen adalah imunogen (Goodman, 1991). Berdasar pada pengertian ini maka yang diperlukan oleh pemeriksaan imunopatologik tersebut adalah antigen, namun untuk membuat antibodinya maka antigen tersebut harus mampu menimbulkan respons imun untuk membuat antibodi. Molekul yang bersifat demikian adalah imunogen.

Pada umumnya petanda yang diperiksa dengan pemerisaan imunohistokimia atau imunositokimia adalah antigen. Antigen dapat berbentuk mikroorganisma yang utuh, seperti virus, bakteri, fungsi atau antigen yang merupakan bagian dari mikroorganisma. Antigen ini tersebut dapat dibuat antibodinya dengan menyuntikkan pada hewan, seperti kambing, domba, kelinci, atau kalkun. Kemampuan untuk menghasilkan antibodi berbeda pada setiap spesies.

Antigen ada yang stabil dan ada pula yang labil. Antigen stabil artinya antigen yang tidak cepat berubah sifat sedang antigen yang labil adalah antigen yang cepat berubah sifat. Perubahan sifat antigen ini dapat disebabkan oleh temperatur, pH, dan lain sebagainya. Berbeda dengan antigen stabil, maka antigen yang labil ini memerlukan penanganan khusus, antara lain harus diproses dalam keadaan segar. Antigen labil ini akan rusak pada saat dilakukan pemrosesan dengan teknik parafin, karena itu antigen demikian harus diproses dengan teknik pendinginan. Dengan demikian maka pemrosesan antigen yang segar ini memerlukan perlakuan khusus. Jaringan segar akan yang akan diperiksa secara imunopatologik, segera setelah diambil dari tubuh, didinginkan dan dapat dipotong dengan teknik potong beku atau dihancurkan untuk dibuat homogenat. Sayatan beku diwarnai dengan teknik imunohistokimia sedang homogenat diwarnai dengan teknik sitokimia.

Untuk pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia terhadap beberapa petanda yang telah tersedia dalam bentuk kit, relatif memudahkan pemeriksaan. Namun sering kali pada pemeriksaan demikian belum dapat dibuat rutin, karena selain memerlukan banyak jenis antibodi yang diperlukan untuk menegakkan diagnosis, juga antibodi tersebut mempunyai masa aktif yang terbatas. Selain itu untuk pemeriksaan jaringan atau sel binatang, tidak semua antibodi tersebut tersedia dalam bentuk kit yang siap dipesan, dan bila membuat antibodi sendiri juga memerlukan waktu yang relatif lama. Keadaan tersebut merupakan kendala yang dihadapi oleh pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia.



Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengurangi kendala pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia, antara lain :

1. pilihlah jenis antibodi yang mempunyai nilai diskriminan yang tinggi, sehingga dapat mengurangi jumlah antibodi yang diperlukan untuk menegakkan diagnosis, evaluasi, memantau dan menentukan prognosis;
2. pilih jenis antibodi yang banyak dibutuhkan, dengan melihat frekuensi kasus yang didapatkan di sentra, dimana laboratorium tersebut berada;
3. simpanlah antibodi dengan baik, ditempat yang dingin, tetapi jangan sampai beku;
4. usahakan mendapatkan antibodi dalam kemasan kecil, sehingga tidak terlalu lama untuk menghabiskan;
5. sebaiknya pilih lebih dulu pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia untuk petanda yang stabil, sehingga dapat dilakukan pemeriksaan pada jaringan yang diproses dengan teknik parafin.

### III. PEMANFAAT PEMERIKSAAN IMUNOPATOLOGIK

Pemeriksaan imunohistokimia dan imunositokimia telah banyak digunakan di bidang kedokteran, baik untuk meningkatkan kualitas pelayanan kesehatan maupun untuk penelitian. Berikut ini akan diketengahkan beberapa pemanfaatan pemeriksaan tersebut, terutama pemeriksaan imunohistokimia di bidang kedokteran.

#### III.1 Pemeriksaan *carcino embryonic antigen* (CEA)

*Carcino embryonic antigen* (CEA) merupakan suatu glikoprotein yang salah satu komponen berasal dari epitel endodermal embrioid. CEA pertama kali ditemukan oleh Thompson dan Gold pada penderita karsinoma kolon. Semula CEA dianggap spesifik untuk karsinoma kolon, mengingat CEA ditemukan pada sekitar 97% penderita kanker kolon. Belakangan diketahui, ternyata CEA ini juga terdapat pada penyakit lain, baik pada tumor ganas maupun tumor jinak.

CEA tidak hanya diproduksi oleh sel tumor, tetapi pada keadaan normal, CEA juga dibuat oleh epitel kolon dan CEA tersebut tidak masuk ke peredaran darah, tetapi segera disekresi ke lumen usus. Bila terjadi kelainan pada mukosa kolon, seperti pada karsinoma kolon, maka infiltrasi sel kanker yang berasal dari sel endodermal dengan berbagai derajat diferensiasi dan maturasi, akan menyebabkan CEA yang dihasilkan dapat masuk ke peredaran darah. Dengan demikian pada penyakit tersebut kadar CEA di darah menjadi tinggi.

CEA merupakan petanda tumor, yang digunakan untuk memantau berbagai proses perkembangan tumor ganas. Yang mempunyai nilai adalah perubahan kadarnya. Atas pertimbangan tersebut maka pengukuran kadar CEA tidak dianjurkan untuk uji saring maupun diagnosis kanker, tetapi kadar CEA ini dapat digunakan untuk evaluasi dan pemantauan hasil pengobatan pada penderita kanker.

Selanjutnya akan disampaikan cara pemeriksaan imunopatologi, yaitu pemeriksaan dengan teknik pewarnaan peroksidase anti peroksidase (PAP), untuk mendeteksi *carcino embryonic antigen*. Karena teknik ini sering digunakan pada pemeriksaan imunohistokimia maka reagen yang diperlukan sudah dapat diperoleh dalam bentuk kit.

### III.1.1 Bahan dan prosedur pemeriksaan CEA

#### a. Bahan

1. Balok parafin jaringan yang akan diperiksa;
2. Irisan balok parafin, dengan irisan setipis mungkin, yaitu sekitar 3 - 6  $\mu$ ;
3. Xilol untuk deparafinisasi, bahan ini diperlukan untuk menghilangkan parafin yang menyelubungi jaringan;

4. Tris buffer salin (TBS), suatu larutan penyangga yang terdiri dari :

Tris 6 gram dalam 1 liter salin.

Larutan penyangga ini mempunyai pH 7,6 dalam 0,05 M HCL, dan pada pewarnaan PAP digunakan untuk pencucian.

Larutan penyangga ini bersifat isotonik dan dapat diganti dengan bahan lain, misalnya :

1. Phosphat Buffer Saline (PBS) pH 7,4.
2. Tris ( hidrokxi metil ) aminometan dengan Buffer pH 7,6.
5. Dilakukan pembilasan preparat dengan metanol 96% ;
6. Campuran metanol dan hidrogen absolut 100 ml + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 % 1 ml.

Bahan ini digunakan untuk menghambat aktifitas enzim peroksidase yang terdapat dalam jaringan.

7. Antibodi primer adalah antibodi terhadap CEA, dibuat dari kelinci untuk manusia.
8. Antibodi sekunder: yaitu anti human globulin dari kelinci. Antibodi ini dibuat untuk antibodi yang berasal dari kelinci, yang sesuai dengan asal antibodi terhadap CEA.

Sebelum digunakan bahan tersebut diencerkan 1/30 - 1/50 sebanyak 100 UI.

9. Anti Horse Radish Peroxidase dari kelinci dan Horse Radish Peroxidase.

Bahan ini merupakan kompleks peroksidase anti peroksidase yang telah diencerkan 16 kali.

10. Diamino benzidine (DAB), merupakan substrat untuk label yang dapat diubah warnanya oleh enzim peroksidase. Bahan ini toksik dan karsinogenik.

Bahan terdiri atas :

3,3 diamino benzidine	60 ml
Tris Buffer pH 7,6	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> yang tak diencerkan	40 ml

Subtrat ini oleh enzim peroksidase dapat berubah menjadi berwarna coklat.

Perubahan warna ini yang digunakan untuk mengetahui adanya ikatan yang terjadi antara antibodi dengan

yang terdapat di jaringan.

Ikatan yang terjadi akan menghasilkan suatu presipitasi ditempat antigen berada, dan presipitat tersebut berwarna coklat.

11. Warna pembanding (*Counter Stain*)

Sebagai warna pembanding dapat digunakan :

1. Hematoksilin
2. Hematoksilin eosin
3. Giemsa.

Warna pembanding ini digunakan untuk mewarnai jaringan di sekitar presipitat, sehingga dengan demikian dapat dikenal lokasi presipitat tersebut.

b. Alat yang diperlukan, adalah :

1. gelas benda;
2. api bunsen;
3. kuas;
4. bak air yang dapat dihangatkan (*water bath*);
5. pemegang balok parafin (*holder*)
6. alat untuk membuat balok parafin, yaitu :  
dua lempengan besi berbentuk huruf L;
7. mikroskop sinar;
8. open untuk menyimpan dalam suhu hangat yang dapat diatur;
9. mikrotom;
10. gelas penutup.



## c. Prosedur pemeriksaan CEA

1. Deperafinisasi dengan xylol selama 5 - 10 menit;
2. irisan jaringan yang mengandung CEA dibilas sebentar dengan metanol 96%;
3. irisan diinkubasi dalam campuran metanol dan hidrogen peroksidase selama 30 menit;
4. irisan jaringan tersebut dicuci dengan Tris Buffer Saline sebanyak 3 kali, 10 menit setiap pencucian;
5. irisan jaringan diinkubasi dengan antibodi primer, yaitu anti CEA, dalam cawan yang diberi kertas filter yang dibasahi dengan air, agar lembab, sekurang-kurangnya selama 30 menit;
6. irisan jaringan dicuci dengan Tris Buffer Saline selama 5 menit;
7. irisan jaringan diinkubasi dengan anti human immunoglobulin dari kelinci, yaitu antibodi terhadap anti CEA, yang merupakan antibodi sekunder;
8. irisan jaringan dicuci dengan Tris Buffer Saline sebanyak 3 kali, selama 10 menit setiap pencucian;
9. irisan diinkubasi dengan antiserum kelinci hutan selama 30 menit;
10. irisan dicuci dengan Tris Buffer Saline sebanyak 3 kali, selama 10 menit setiap pencucian;
11. irisan diinkubasi dengan PAP selama 30 menit;
12. irisan dicuci dengan Tris Buffer Saline sebanyak 2 kali, selama 10 menit setiap pencucian;
13. irisan diinkubasi dengan DAB selama 5 - 10 menit;
14. irisan dicuci dengan Tris Buffer Saline sebanyak 3 kali, selama 10 menit setiap pencucian;
15. selanjutnya irisan jaringan diwarnai dengan pewarna pembanding, yaitu dengan hematoksilin atau HE.

### III.1.2 Hasil pewarnaan CEA

Jaringan yang mengandung CEA, pada pewarnaan peroksidase anti peroksidase akan menunjukkan warna coklat. Warna ini terjadi akibat adanya ikatan antibodi CEA dengan antigen CEA di jaringan dan label yang berupa substrat DAB. Substrat DAB oleh enzim peroksidase diubah menjadi bahan berwarna coklat. Preparat yang berwarna coklat berarti pewarnaan CEA positif. Dengan teknik pengujian peroksidase anti peroksidase (PAP) demikian, dapat dibuktikan keberadaan CEA di jaringan dengan menggunakan mikroskop biasa atau mikroskop sinar.

Lokasi presipitat CEA akan tampak lebih jelas dengan pemberian warna pembanding (*Counter Stain*) hematoksilin, atau hematoksilin eosin atau Giemsa, sehingga warna coklat tampak lebih kontras.

Pada saat ini teknik imunoperoksidase sudah dikenal sebagai suatu metode yang digunakan untuk menunjukkan bermacam-macam antigen atau petanda tumor. Teknik imunoperoksidase ada dua macam, yaitu teknik peroksidase langsung dan teknik peroksidase tidak langsung. Teknik peroksidase antiperoksidase tidak langsung merupakan suatu teknik pewarnaan yang mempunyai sensitifitas yang tinggi untuk untuk memeriksa *carcino embryonic antigen* (CEA) dalam jaringan pada irisan jaringan yang berasal dari balok parafin. Spesifitas antibodi primer dan penggunaan kontrol merupakan koreksi interpretasi dari hasil pewarnaan.

Suatu pewarnaan tumor dengan menggunakan petanda CEA dapat membantu diagnosis adenokarsinoma. Petanda CEA juga dapat membedakan sel kanker dari metastasis karsinoma dengan mesotelium yang

reaktif, dan mesotelioma. Pada kedua sel terakhir, yaitu mesoteliom yang reaktif dan mesotelioma, petanda CEA tidak didapatkan pada keduanya.

Suatu glikoprotein yang secara imunologik mirip dengan CEA dapat diisolasi dari mukosa kolon normal pada orang dewasa. Glikoprotein tersebut dengan pemeriksaan imunofluoresensi dapat diketahui lokasinya, yaitu selain didapatkan pada mukosa orang dewasa normal, juga didapatkan pada mukosa kolon normal dari anak dan jaringan hemoroid. Namun ada beberapa pemeriksaan imunohistokimia atau immunositokimia yang tidak dapat menunjukkan petanda CEA pada kolon normal. Hal ini mungkin karena rendahnya kadar di mukosa kolon, sehingga teknik peroksidase dan imunofluoresensi tidak mampu mengenalnya atau mungkin disebabkan oleh perbedaan spesifitas antibodi CEA yang menentukan sensitifitas teknik immunositokimia. Selain itu jenis tekniknya juga sangat mempengaruhi hasil pemeriksaan.

Wiley dan kawan - kawan hanya menemukan sekitar 51% tumor kolon yang menunjukkan CEA positif. Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan suatu antibodi kelinci yang tak dimurnikan. Heyderman dan kawan-kawan melaporkan bahwa sekitar 25 % karsinoma prostat menunjukkan CEA yang positif. Variasi prosentase temuan petanda CEA positif ini mungkin disebabkan oleh penggunaan antibodi yang berbeda sumbernya. Walaupun teknik yang digunakan sama, yaitu teknik imunoperoksidase, tetapi bila ada perbedaan akan sumber antibodi, waktu fiksasi dan pemrosesannya, maka hasil pemeriksaannya akan berbeda.



Untuk membedakan antara hasil positif dan negatif harus juga dilakukan secara kuantitatif karena uji imunoperoksidase hanya dapat mendeteksi CEA dengan konsentrasi 3 ug/g atau lebih pada spesimen yang difiksasi dengan formalin. Dengan demikian kadar yang lebih rendah dari kadar tersebut akan sulit diketahui. Namun demikian sejauh ini pemeriksaan CEA dapat digunakan sebagai parameter pemantauan proses keganasan. Metode peroksidase anti-peroksidase (PAP) sering digunakan karena relatif mudah, dan cukup sensitif.

### III.2 Pemeriksaan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan *Alfa Feto Protein* (AFP)

Kanker testis merupakan bentuk keganasan yang menyerang laki-laki. Kanker testis mempunyai derajat keganasan yang tergolong tinggi dan frekuensi kanker ini sekitar 2% dari seluruh tumor ganas yang menyerang laki-laki atau sekitar 20% dari seluruh tumor ganas tractus urogenitalis. Pada umumnya, penderita kanker testis berumur sekitar 29 - 34 tahun.

Pada kanker testis dilakukan pemeriksaan hormon, seperti hormon estrogen, progesteron dan testosteron. Namun menurut Taylor, pada pemeriksaan hormon tersebut terdapat kesukaran untuk menginterpretasikan hasilnya. Karena kendala tersebut, maka selanjutnya digunakan pemeriksaan adanya *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan *Alfa Feto Protein* (AFP). Pemeriksaan kedua petanda yang bersamaan berada di jaringan tumor testis ini akan lebih menguntungkan bila dapat diperiksa secara bersama. Selain pemeriksaan ini lebih cepat, lebih praktis dan lebih murah, pemeriksaan ini mempunyai nilai diskriptif yang lebih baik di-

bandingkan bila dilakukan secara terpisah.

Ada beberapa macam teknik pemeriksaan untuk menentukan adanya *human chorionic gonadotropin* (HCG) dan Alfa Feto Protein (AFP), yaitu :

1. *Radio Immuno Assay* (RIA);
2. Imunofluoresen;
3. Imunositokimia.

Menurut Kitajima, dari ketiga cara tersebut pemeriksaan imunositokimia merupakan cara yang paling ideal. Teknik pemeriksaan tersebut telah dirintis sejak tahun 1966, yaitu sejak ditemukannya enzim sebagai bahan untuk melabel antibodi.

Teknik imunositokimia untuk *human chorionic gonadotropin* dan *alfa feto protein* ini ada tiga macam, yaitu :

1. metode langsung;
2. metode tidak langsung;
3. metode enzim antibodi yang tidak dilabel.

Namun pada kali ini hanya dikemukakan penggunaan metode imunoperoksidase tidak langsung, yang menggunakan pewarnaan ganda untuk menentukan adanya *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan *Alfa Feto Protein* (AFP) pada tumor testis. Diharapkan dengan menggunakan metode tersebut, tumor testis dapat diketahui sedini mungkin dengan mengenali perubahan *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan *Alfa Feto Protein* (AFP).

### III.2.1 Bahan dan prosedur pemeriksaan

Bahan dan prosedur pemeriksaan HCG dan AFT perlu diketengahkan, agar teknik pemeriksaan ini dapat difahami dengan baik. Walaupun pemeriksaan tersebut tidak dikerjakan sendiri, namun bila memahami prosedur maka kesalahan yang mungkin terjadi dapat diprakirakan kesalahannya.

#### a. Bahan

##### 1. Sediaan tumor testis

1. Jaringan tumor dari hasil pembedahan

2. Bahan fiksasi, yaitu :

1. 95% etanol atau

2. 10% larutan Buffer Formalin

Jaringan tumor difiksasi selama 24 jam.

3. Reagen untuk proses fiksasi, yaitu

Alkohol dengan berbagai konsentrasi yang digunakan untuk dehidrasi,

Xilol yang digunakan untuk penjernihan,

Parafin yang digunakan untuk impregnasi dan pembuatan balok parafin;

4. Mounting medium;

5. Balok parafin yang berisi jaringan memerlukan pemotongan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4  $\mu$ .

2. Anti serum primer

1. Anti HCG - a dari serum kelinci;
2. Serbuk AFP yang berasal dari tumor testis yang diekstraksi dengan aceton.

Antibodi primer ini tidak dilabel

3. Anti serum sekunder

Anti - rabbit g globulin dari domba dilabel dengan horseradish peroxidase;

4. Bahan kontrol (kontrol positif)

1. Anti HCG - a serum diikatkan pada HCG, sedang anti AFP diikatkan pada AFP;
2. Campuran antigen - antibodi tersebut diinkubasi 37<sup>0</sup>C selama 1 jam;
3. Apabila campuran tersebut tidak langsung digunakan maka harus disimpan pada suhu 4<sup>0</sup>C dengan waktu maksimal 5 hari;
4. Dicentrifuge;
5. Supernatannya diwarnai.

5. Reagen penunjang, seperti :

1. 0,001 M Phosphate Buffered Saline pH 7,2;
2. 4-Cl-Inaphthol Pyronin;
3. 2 M Glycine HCl Buffer pH 2,0.

b. Alat yang diperlukan, adalah :

1. gelas benda;
2. api bunsen;
3. kuas;
4. bak air yang dapat dihangatkan (*water bath*);

5. pemegang balok parafin (*holder*)
6. alat untuk membuat balok parafin, yaitu :  
dua lempengan besi berbentuk huruf L;
7. mikroskop sinar;
8. open untuk menyimpan dalam suhu hangat yang dapat diatur;
9. mikrotom;
10. gelas penutup.

c. Prosedur pewarnaan

1. Sediaan yang berasal dari irisan balok parafin yang berisis jaringan tumor testis, diinkubasi dengan anti HCG pada suhu kamar, selama 30 menit;
2. kemudian irisan balok parafin tersebut dilakukan pencucian dengan 0,001 M Phosphate Buffered Saline pH 7,2 , pencucian tersebut dimaksudkan untuk menghilangkan sisa antibodi yang tidak terikat agar tidak mengganggu hasil pewarnaan;
3. irisan jaringan dibalok parafin diinkubasi dengan anti - rabbit - g globulin pada suhu kamar selama 30 menit;
4. kemudian ditambah dengan substrat 3,3 - diaminobenzidine (DAB), substrat ini yang akan berubah warna. dan perubahan warna ini dijadikan label adanya ikatan antigen-antibodi;
5. selanjutnya irisan tersebut diinkubasi dalam 2 M Glycine HCL Buffer Saline pH 2,0 pada suhu kamar selama 48 jam, sehingga kompleks antigen - antibodi terurai;

6. irisan tersebut dicuci dengan 0,001 M Phosphate Buffered Saline dengan pH 7,2;
7. kemudian irisan ditambahkan anti AFP untuk mendeteksi adanya AFP pada suhu kamar selama 30 menit;
8. irisan tersebut diinkubasi dengan anti - rabbit - g globulin pada suhu kamar selama 30 menit;
9. selanjutnya irisan tersebut ditambah dengan substrat 4 - Cl - Inaphthol.

Hasil pewarnaan dilihat dengan menggunakan mikroskop sinar. Sediaan jaringan tumor testis yang mengandung *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan Alfa Feto Protein (AFP) akan tampak sebagai berikut :

1. Sitoplasma sel yang mengandung *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) tampak berwarna coklat;  
Misal : pada sitoplasma sel dari *syncytiotrophoblastic giant* akan berwarna coklat;
2. Sitoplasma sel yang mengandung AFP berwarna biru;  
Misal : pada sitoplasma mikrositik dan *myxomatous cells* akan berwarna biru.

Selain sediaan yang diperiksa, diperlukan sediaan untuk kontrol positif. Pada sediaan kontrol positif tampak :

1. sitoplasma *syncytiotrophoblastic giant cells* berwarna coklat;
2. sitoplasma mikrositik dan *myxomatous cells* berwarna biru.

*Human Chorionic Gonadotropin (HCG)* merupakan glikoprotein yang disekresi oleh sel *syncytiotrophoblastic* dari plasenta normal. Glikoprotein tersebut mempunyai BM 30.000. Fraksi  $\gamma_2$  dan  $\alpha$  globulin dari *Human Chorionic Gonadotropin (HCG)*, merupakan glikoprotein yang dikenal sebagai petanda tumor.

*Alfa Feto Protein (AFP)* adalah protein yang terbanyak dalam fetus manusia, dan merupakan fraksi  $\gamma_1$  globulin yang mempunyai BM 70.000. Setelah lahir, kadar alfa feto protein (AFP) akan turun, dan bila setelah lahir kadar alfa feto protein masih didapatkan dalam kadar yang tinggi atau meningkat, maka kadar ini dapat dijadikan sebagai petanda tumor.

Untuk menentukan adanya *human chorionic gonadotropin (HCG)* dan *alfa feto protein (AFP)* pada tumor testis dapat dilakukan suatu pemeriksaan yang menggunakan metode imunoperiodase tidak langsung dengan pewarnaan ganda, seperti yang prosedurnya telah disampaikan terdahulu.

Selain metode imunoperoksidase, ada metode lain yang dapat digunakan untuk mengenali lokalisasi *human chorionic gonadotropin (HCG)* atau alfa feto protein (AFP), metode tersebut adalah metode *Radio Immuno Assay (RIA)* atau dengan menggunakan metode imunofluoresensi. Metode imunofluoresensi ini menggunakan label bahan yang dapat memberikan pendaran atau fluoresensi. Bahan tersebut antara lain rhodamin dan fluoresinisocianat (FITC).

Dibanding dengan teknik imunoperoksidase, kedua teknik alternatif, yaitu teknik imunofluoresensi dan radio immuno assay, memerlukan peralatan yang relatif mahal dan khusus untuk Radio Immuno Assay (RIA), meskipun metode ini sensitif dan spesifik,

namun karena metode ini menggunakan suatu bahan radio aktif yang sangat berbahaya bagi manusia, maka pelaksanaannya cukup rumit dan memerlukan persiapan tambahan. Dianjurkan RIA hanya dilakukan oleh peneliti atau teknisi yang telah terdidik dan terampil serta telah memahami betul bahaya dan cara pencegahan dan cara mengatasi bahaya radioaktif.

Mengingat hal tersebut diatas, maka perlu dikembangkan suatu metode pemeriksaan yang lebih sederhana, relatif murah dan tidak berbahaya bagi manusia, seperti metode imunoperoksidase. Metode imunoperoksidase merupakan suatu metode gabungan antara metode imunofluoresensi dan metode *Enzyme Linked Sorbent Assay* (ELISA).

Metode imunoperoksidase tidak langsung dengan pewarnaan ganda, seperti pada pewarnaan yang digunakan untuk pewarnaan HCG dan AFP, digunakan dua bahan pewarna yang berbeda dan dua antibodi, yaitu antibodi primer yang tidak dilabel dan antibodi sekunder yang dilabel (peroksidase). Pemeriksaan demikian akan sangat efektif untuk memeriksa petanda yang ditemukan secara bersama dalam satu kanker, sehingga dengan pemeriksaan yang kombinasi akan lebih meningkatkan keakuratan pemeriksaan tersebut.

Bosman dkk berpendapat bahwa Human Chorionic Gonadotropin (HCG) dan Alfa Feto Protein (AFP) kadang-kala didapatkan dalam sel yang sama. Dan ini dapat dilihat dengan pewarnaan ganda metode Immunoperoksidase. Pada tumor testis dapat ditemukan dua antigen, yaitu Human Chorionic Gonadotropin (HCG) dan Alfa Feto Protein (AFP). Pemeriksaan keduanya dengan sekali pemeriksaan dapat dilakukan dengan menggunakan teknik pemeriksaan imunoperoksidase tidak langsung dengan pewarnaan ganda. Serum primer yang



mengandung anti HCG dan anti AFP, dapat berikatan dengan HCG atau AFP.

Human chorionic gonadotropin (HCG) yang ada pada jaringan tumor testis dapat berkaitan dengan antibodi primer yang mengandung anti HCG sehingga terbentuk suatu ikatan HCG - anti HCG. Kemudian ditambahkan antibodi sekunder yang telah dilabel (peroksidase), maka terbentuklah ikatan HCG - anti HCG berlabel. Bila ditambahkan substrat akan bereaksi dengan enzim peroksidase sehingga menimbulkan warna. Kemudian ditambahkan serum yang mengandung anti AFP, maka AFP yang ada pada jaringan tumor testis juga akan berikatan dengan anti AFP, yang akan membentuk ikatan AFP - anti AFP, seperti hal yang terjadi pada HCG. Setelah terbentuk ikatan AFP - anti AFP, kemudian ditambahkan suatu antibodi sekunder yang dilabel dengan peroksidase, sehingga terbentuk ikatan AFP - anti AFP berlabel. Penambahan ini inipun akan menimbulkan warna yang berbeda dengan warna pertama. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan substrat yang diberikan. Dengan demikian maka antigen HCG dan AFP secara bersama pada satu sediaan, keduanya telah diwarnai dengan warna yang berbeda.

Pada tumor testis diketahui terdapat peningkatan kandungan human chorionic gonadotropin (HCG) dan alfa fetoprotein (AFP) yang dapat dijadikan sebagai petanda adanya keganasan. Metode imunoperoxidase tidak langsung dengan teknik pewarnaan ganda, yang didasarkan pada reaksi antigen - antibodi dapat digunakan untuk mendeteksi adanya human chorionic gonadotropin (HCG) dan alfa fetoprotein (AFP) pada jaringan. Dengan demikian maka metode imunoperoxidase tidak langsung dengan pewarnaan ganda dapat dipakai sebagai pemeriksaan adanya tumor testis.

Dengan demikian jelas kiranya, bahwa metode immunoperoxidase tidak langsung dengan pewarnaan ganda dapat digunakan untuk mengetahui lokalisasi dari antigen yang berada secara bersama dalam suatu sediaan. Hal tersebut telah dicontohkan pada pemeriksaan *Human Chorionic Gonadotropin (HCG)* dan *Alfa Feto Protein (AFP)* pada tumor testis.

### III.3 Pemeriksaan imunohistokimia pada Limfoma Maligna

Limfoma Maligna adalah nama dari tumor kelenjar getah bening. Keganasan kelenjar getah bening ini semula dikenal dengan nama Limfoma atau Limfosarkoma. Penyakit ini pertama kali dilaporkan oleh Thomas Hogkin pada 1832. Selanjutnya oleh Bill Roth pada tahun 1871, diperkenalkan istilah Limfoma Maligna. Akhirnya istilah tersebut yang digunakan sebagai nama kanker tersebut secara luas di Amerika Serikat.

Sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi pada saat ini, maka dewasa ini teknik peroksidase anti peroksidase dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai macam penyakit seperti halnya penyakit Limfoma Maligna. Teknik immunoperoxidase ini dapat digunakan untuk mendeteksi Limfoma Maligna, baik yang berasal dari limfosit T maupun limfosit B. Selanjutnya akan diuraikan pemeriksaan limfoma maligna dari limfosit B dengan menggunakan teknik perwarnaan peroksidase anti peroksidase (PAP).

Teknik Immunoperoxidase adalah suatu teknik pengganti dari teknik imunofluoresensi yang mempunyai banyak kelemahan dan kendala. Teknik peroksidase anti peroksidase tersebut menggunakan substrat dan enzim peroksidase sebagai label. Perubahan warna

yang terjadi yang digunakan untuk mengetahui keberadaan antigen yang diperiksa.

Teknik Imunoperoksidase dikelompoknya menjadi 2 kelompok, yaitu :

1. Cara yang menggunakan Horse Radish Peroksidase (HRP) dalam ikatan konjugat, yaitu :

1. Uji Imunoperoksidase langsung
2. Uji Imunoperoksidase tak langsung
3. Teknik Avidin - Biotin

2. Cara yang menggunakan Horse Radish Peroksidase tidak dalam ikatan konjugat, yaitu :

Uji Peroksidase Anti Peroksidase

### III.3.1 Bahan dan prosedur kerja

#### a. Bahan

1. Biopsi kelenjar getah bening

Biopsi kelenjar getah bening berasal dari seorang penderita yang diduga mempunyai kasus Limfoma Maligna;

sebagai kelompok kontrol digunakan jaringan kelenjar getah bening yang berasal dari penderita yang mempunyai kelenjar getah bening yang hiperplasia reaktif.

2. Metanol dengan kandungan  $H_2O_2$  0,6.

3. Serum angsa normal.

4. Antiserum anti kelinci.

5. Protein serum anti kelinci.
  6. Peroksidase Anti Peroksidase.
  7. Pewarna yang terdiri dari :
    1. 3-amino 9 - etil karbasol, yang digunakan untuk pengecatan sitoplasma;
    2. hematoksilin untuk pewarnaan inti.
  8. Jelly gliserin sebagai bahan *Mounting*;
  9. Albumin;
  10. Phosphate Buffer Saline (PBS).
- b. Alat yang diperlukan, adalah :
1. gelas benda;
  2. api bunsen;
  3. kuas;
  4. bak air yang dapat dihangatkan (*water bath*);
  5. pemegang balok parafin (*holder*)
  6. alat untuk membuat balok parafin, yaitu :  
dua lempengan besi berbentuk huruf L;
  7. mikroskop sinar;
  8. open untuk menyimpan dalam suhu hangat yang dapat diatur;
  9. mikrotom;
  10. gelas penutup.

## c. Prosedur pewarnaan

1. Irisan jaringan dari balok parafin dilakukan deparafinisasi;
2. kemudian irisan jaringan tersebut direndam dalam  $H_2O_2$  0,6% dalam metanol selama 20 menit;
3. irisan tersebut direndam dalam serum angsa normal 1/20 selama 10 menit;
4. selanjutnya irisan tersebut ditambah dengan antisera untuk manusia yang dibuat dari kelinci, selama 60 menit;
5. irisan ditambah dengan serum anti kelinci dari protein serum anti kelinci 1/20, selama 30 menit;
6. lalu dicuci dengan phospat buffer saline (PBS) selama 5 menit;
7. irisan tersebut ditambah dengan Peroksidase Anti Peroksidase selama 30 menit;
8. irisan dicuci dengan PBS selama 15 menit;
9. irisan diberi substrat 3 amino 9 etil karbasol, selama 30 - 60 menit;
10. irisan dicuci dengan PBS selama 5 menit;
11. irisan tersebut diberi warna pembanding dengan hematoksilin;
12. selanjutnya irisan yang telah dicuci dan dijernihkan diberi media *Mounting*.

Hasil pewarnaan diperiksa dengan menggunakan mikroskop cahaya. Pemeriksaan dengan teknik peroksidase anti peroksidase (PAP) ini dikatakan positif bila ditemukan warna coklat. Warna tersebut digunakan sebagai tanda adanya bahan antigenik intraseluler yang sesuai dengan antibodi yang digunakan dalam pemerik-

saan. Bahan antigenik intraseluler tersebut pada sediaan preparat dari biopsi jaringan limfoma maligna difus yang berasal dari limfosit B tampak berwarna coklat atau coklat kemerahan.

Akan tetapi bila tidak berwarna coklat atau coklat kemerahan bukan berarti tidak ada keganasan limfoma maligna. Hal ini karena keganasan limfoma maligna yang difus yang berasal dari limfosit T, ditandai oleh adanya bentukan roset. Tanda tersebut tidak memberikan warna merah pada pewarnaan peroksidase antiperoxidase (PAP).

Irisan jaringan yang berisi limfosit kecil, dengan inti bergaris tengah 6 - 8  $\mu$ , berbentuk bulat, dapat berlekuk atau bercelah dalam, dengan kromatin yang tersebar secara acak dan sitoplasma limfosit kecil ini amat sedikit. Limfosit T dan limfosit B secara normal tidak dapat dibedakan secara morfologi dengan mikroskop cahaya biasa, tapi dalam pelbagai keadaan dapat diketahui morfologi limfosit B dan limfosit T yang neoplastik.

Perbedaan yang paling nyata antara limfosit B dan limfosit T adalah adanya imunoglobulin permukaan di membran limfosit B dan petanda tersebut tidak ditemukan pada limfosit T. Selama proses pendewasaan, jenis imunoglobulin permukaan di membran limfosit tersebut berubah dan perubahan ini merupakan petanda adanya diferensiasi limfosit yang bersangkutan. Pada umumnya imunoglobulin permukaan di membran limfosit adalah Ig M dan Ig D, keduanya dapat secara bersamaan terdapat di permukaan limfosit.

Penentuan imunoglobulin permukaan di membran limfosit pada umumnya sukar. Hal ini karena pengaruh variasi sensitifitas antisera yang digunakan amat besar. Variasi sensitifitas ini agak

tertolong oleh tersedianya antisera yang baku di pasaran, baik secara terpisah atau dalam bentuk kit.

Teknik pewarnaan imunohistokimia atau imunositokimia yang sudah pernah digunakan dalam studi limfoma, antara lain pemeriksaan secara homogenat atau dengan menggunakan larutan limfosit yang diperiksa dengan indikator pembentukan roset dari eritrosit atau imunofluoresensi. Pemeriksaan demikian dapat menimbulkan masalah, yaitu terutama sebagai akibat pemeriksaan sediaan yang berasal dari larutan limfosit atau homogenat. Pada sediaan yang diambil dari jaringan tumor yang dibuat homogenat atau dalam larutan sel, yang akan mengalami kesulitan untuk mendapatkan sel yang tahan hidup cukup lama dalam larutan, sehingga pada pemeriksaan larutan sel tersebut banyak dijumpai sel yang telah rusak. Selain itu sediaan yang dibuat dari bentuk homogenat atau larutan akan timbul masalah topografi dan asal sel yang diperiksa, tidak dapat dilacak.

Pemeriksaan dengan teknik imunofluoresensi juga mempunyai keterbatasan, karena pada pemotongan dingin irisan lebih tebal dibanding dengan teknik parafin, sehingga pemakaian mikroskop imunofluoresensi akan mengalami kesulitan untuk membedakan antara limfosit dan monosit. Selain itu mikroskop fluoresensi dan alat potong dengan pendinginan atau *cryostate* lebih mahal dibanding dengan pemeriksaan yang menggunakan mikroskop sinar. Namun pada keadaan tertentu, pemeriksaan dengan teknik dingin tidak mungkin dihindari, manakala antigen yang diperiksa merupakan antigen yang tidak stabil.

Pada pemeriksaan limfoma maligna Non-Hodgkin, pemeriksaan imunohistokimia dengan teknik peroksidase anti peroksidase dapat

menghindari kesulitan tersebut. Pemeriksaan tersebut lebih praktis, secara morfologik, lokasi antigen dapat diketahui, dan biaya yang diperlukan lebih murah.

Pemeriksaan peroksidase anti peroksidase (PAP) yang digunakan pada pemeriksaan limfoma ini menggunakan tiga reagen utama, yaitu :

1. Antibodi primer yang bersifat spesifik terhadap antigen yang akan ditentukan;
2. Antibodi sekunder atau antibodi penghubung yang dapat mengikat antibodi primer dan kompleks PAP, hal ini disebabkan keduanya dibuat dari spesies hewan yang sama;
3. Kompleks peroksidase anti peroksidase (PAP).

Seperti pemeriksaan peroksidase terdahulu, maka enzim peroksidase dengan penambahan substrat yang mengandung bahan kromogen, akan menimbulkan warna coklat atau coklat kemerahan. Dengan demikian maka pemeriksaan peroksidase anti peroksidase (PAP) dapat digunakan untuk mendeteksi limfosit B dari keganasan limfoma Maligna Non-Hodgkin yang difus. Namun demikian pemeriksaan tersebut akan menjadi lebih baik, bila ditunjang dengan pemeriksaan yang lain, yaitu :

1. aktifitas esterase non spesifik, dan
2. pewarnaan acid fosfatase, yang pada sediaan tampak difus.



### III.4 Pemeriksaan Lisozim pada Penyakit Hati Kronik

Pemeriksaan imunositokimia untuk menetapkan lokasi imunogen baik di sel maupun di jaringan semakin banyak digunakan. Perkembangan teknik pewarnaan imunositokimia ini sejalan dengan perkembangan imunologi. Pemeriksaan imunositokimia pada hepatosit berdasarkan pada reaksi antigen di hepatosit dengan antibodinya. Karena pemeriksaan ini menggunakan label yang berdasar pada perubahan substrat di amino bensidin (DAB) maka pemeriksaan tersebut juga dikenal sebagai pemeriksaan imunoperoksidase.

Pemeriksaan imunoperoksidase merupakan pemeriksaan yang menggunakan enzim peroksidase serum kuda atau *horseradish peroxidase* (HRP) dan *di amino benzydine* (DAB) sebagai substrat, serta memakai antibodi, baik antibodi primer maupun sekunder. Pemeriksaan imunoperoksidase tersebut banyak digunakan untuk pemeriksaan sediaan jaringan dan sel, termasuk hepatosit. Peningkatan aktifitas enzim lisosim pada penyakit hati kronik dapat pula diperiksa dengan pewarnaan imunoperoksidase. Aktifitas enzim lisosim pada penyakit hati kronik ini dapat diperiksa dengan menggunakan pemeriksaan imunoperoksidase, baik secara tidak langsung atau secara langsung. Pemeriksaan ini bermanfaat untuk :

1. membantu menegakkan diagnosis penyakit hati kronik;
2. memberi alternatif pemeriksaan laboratorium dalam menegakkan diagnosis penyakit kronik.

Seperti telah diuraikan terdahulu, pemeriksaan imunoperoxidase merupakan pemeriksaan yang berdasar pada suatu reaksi antigen - antibodi, yang menggunakan *horseradish peroxidase enzyme*. Pada pemeriksaan penyakit hati kronik, dapat menggunakan

beberapa teknik pemeriksaan imunoperoksidase, antara lain :

1. Teknik antibodi yang berlabel peroksidase, yaitu :

a. Teknik antibodi berlabel peroksidase yang langsung

Teknik antibodi berlabel peroksidase yang langsung merupakan teknik yang imunoperoksidase yang paling sederhana.

Secara ringkas, pemeriksaan dengan teknik antibodi berlabel peroksidase secara langsung, pada dasarnya dilakukan dengan mereaksikan antibodi yang berlabel peroksidase dengan antigen. Ikatan terjadi secara spesifik antara antibodi dengan antigen. Enzim peroksidase mengubah substrat DAB sehingga. Enzim berwarna coklat. Warna coklat ini hanya terdapat pada kompleks yang berikatan dengan antibodi yang berlabel tersebut, sedang antibodi yang tidak terikat akan larut pada saat pencucian.

Dengan demikian bila ada warna tersebut, maka sediaan yang diperiksa mempunyai antigen yang sesuai dengan antibodi yang dilabel tersebut.

b. Teknik imunoperoksidase tidak langsung

Teknik imunoperoksidase tidak langsung, pada sediaan yang mengandung antigen yang akan ditentukan, ditambah dengan antibodi primer yang tidak dilabel, sehingga terjadi ikatan antibodi primer dengan antigen.

Kemudian diberikan antibodi sekunder, yaitu Anti Gamma Globulin terhadap Antibodi primer, antibodi sekunder ini diberi konjugat peroksidase.

Metode ini lebih sensitif dan spesifik bila dibandingkan dengan teknik langsung.

## 2. Teknik antibodi yang tidak dilabel peroxidase

Teknik antibodi yang tidak dilabel peroxidase menggunakan enzim peroksidase tidak dalam bentuk konjugat tetapi dalam bentuk ikatan imonologik, yaitu kompleks imun. Salah satu dari metode ini adalah teknik *Peroxidase Anti Peroksidase* (PAP).

Pada dasarnya teknik *Peroxidase Anti Peroxidase* (PAP) menggunakan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen di sel atau jaringan, molekul tersebut akan mengadakan ikatan imunologik.

Kemudian ikatan tersebut ditambahkan antibodi sekunder dengan kompleks peroksidase antiperoksidase dan DAB.

Hal ini dimaksudkan agar sediaan tersebut dapat terlihat pada pemeriksaan mikroskop sinar.

Seperti telah diuraikan, bahwa pada pemeriksaan imunoperoxidase, baik yang teknik antibodi berlabel maupun teknik antibodi tanpa label, keduanya memakai konjugat enzim peroksidase yang berasal dari serum kuda. Enzim demikian disebut sebagai *Horse-radish Peroxsidase Enzyme* yang dapat memecah substrat *Diamino Benzidine* (DAB), yang memberikan warna coklat.

Prinsip teknik antibodi yang dilabel dengan peroksidase cara tidak langsung pada lisozim di jaringan hati :

Lisozim yang terdapat pada jaringan hati merupakan antigen yang akan diperiksa dengan mengikatkan dengan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen tersebut.

Kemudian tambahkan antibodi sekunder, agar bisa terlihat dengan pemeriksaan mikroskop sinar maka antibodi sekunder yang ditambahkan perlu diberi konjugat enzim peroksidase

yang mampu memecah substrat *Diamino Benzidine* (DAB).

## III.4.1 Bahan dan prosedur pemeriksaan

## a. Bahan

1. Bahan fixsasi,  
Formalin buffer 10%;
2. Xilol untuk deparafinisasi;
3. Alkohol dari konsentrasi tinggi ke rendah  
untuk hidrasi;
4. Alkohol dari konsentrasi rendah ke tinggi  
untuk dehidrasi;
5. Perekat jaringan,  
Gelatin;
6. Antibodi primer :  
Antiserum kelinci terhadap lisozim, yaitu antibodi  
yang spesifik terhadap lisozim;
7. Antibodi sekunder :  
Antiserum terhadap Gamma Globulin kelinci, yaitu  
Antiserum dari kambing terhadap imunoglobulin kelin-  
ci, yang dilabel dengan *Horse Radish Peroxidase*  
*Enzyme*;
8. Substrat kromogen :  
Diamino Benzidine (DAB);
9. Phosphat Buffer Saline (PBS) pH 7,4q0,2
 

Sodium Chlorida	8	g
Sodium Phosphat, Dibasic Anhydrous	1,15	g
Potasium Chloride	0,2	g
Potasium Phosphat Monobasic Anhydrous	0,2	g
Aquadest	1	L

10. Counter Stain :

Meyer Hematoxylin,

Ammonia Water : Ammonium Hydroxide 1,4 ml.  
Aquadest 250 ml.

11. Mounting medium :

*Permanent Aqueous Mounting Medium.*

b. Alat

1. Mikroskop sinar;
2. Rotary mikrorom;
3. Waterbath;
4. Inkubator;
5. Tempat pengecatan;
7. Timer;
8. Gelas benda (*Obyek glass*);
9. Gelas penutup (*Cover glass*);
10. Pipet serologik;

c. Cara kerja

1. Sediaan irisan balok parafin yang berisi jaringan hati kronik, dilakukan deparafinisasi dengan menggunakan xilol, deparafinisasi ini untuk menghilangkan parafin;
2. sediaan tersebut dilakukan proses hidrasi dengan etil alkohol dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah, maksud hidrasi untuk memberikan mengganti medium minyak dengan medium air;

3. Cuci dengan PBS;
4. sediaan diberi antibodi primer yang spesifik terhadap lisozim ( antigen ), kemudian diinkubasikan selama 20 menit;
5. sediaan dicuci dengan PBS selama 1 menit;
6. tambahkan antibodi sekunder yang berkonjugat, dengan menginkubasikan selama 20 menit;
7. cuci dengan PBS selama 1 menit;
8. sediaan ditambah dengan substrat di amino benzidine (DAB), dan diinkubasikan selama 20 menit;
9. cuci dengan PBS selama 1 menit;
10. sediaan diwarnai dengan pewarna pembanding, yaitu Hematoksilin dari Meyer, selama 5 menit;
11. cuci dengan air kran atau air mengalir;
12. berikan ammonia air selama 10 detik, atau sampai warna berubah menjadi ke biruan;
13. cuci dengan air kran atau air mengalir;
14. kemudian dilakukan dehidrasi dengan menggunakan etil alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi;
15. dilakukan *clearing* dengan xilol;
16. sediaan yang masih basah di *mounting*;
17. pemeriksaan sediaan dengan menggunakan mikroskop sinar.

Kenaikkan jumlah aktivitas lisozim yang diproduksi oleh sel intralobular merupakan tanda *Primary Biliary Cirrhosis* (PBC) dan hepatitis kronik. Salah satu cara untuk mengetahui aktifitas enzim tersebut pada hepatitis kronik, dengan menggunakan teknik imunoperoksidase secara tidak langsung.

Pada pemeriksaan ini menggunakan antibodi primer, yaitu antibodi berasal dari kelinci yang spesifik terhadap lisozim manusia, sehingga terjadi ikatan antigen dengan antibodi primer. Kemudian antibodi primer yang mengikat lisozim, diikat oleh antibodi sekunder yang telah diberi konjugat peroksidase. Untuk mengetahui adanya lisozim di jaringan hati, sediaan tersebut ditambahkan dengan substrat yang merupakan suatu indikator. Substrat tersebut adalah di amino benzidine tetra (DAB), yang oleh peroksidase diubah menjadi berubah coklat.

Prinsip dari imunohistokimia dengan teknik antibodi yang di label dengan peroksidase secara tidak langsung, yang digunakan untuk diagnosis *Primary Billiary Cirrhosis* dan *Chronic Hepatitis*, adalah sebagai berikut :

1. Lisozim yang terdapat pada jaringan merupakan antigen yang akan diperiksa yang diikat oleh antibodi primer yang spesifik terhadap lisozim tersebut.
2. Antibodi primer yang mengikat lisozim diikat oleh antibodi sekunder yang mempunyai konjugat peroksidase.
3. Substrat akan diubah oleh peroksidase sehingga berwarna coklat, warna ini yang digunakan sebagai indikator pemeriksaan adanya lisozim di jaringan hati.

Sediaan jaringan hati yang bereaksi positif, dengan mikroskop sinar menunjukkan warna coklat. Warna coklat ini terdapat di sitoplasma, sedang warna biru terdapat di inti pada semua sediaan yang diperiksa, baik yang positif maupun yang negatif.



### III.5 Pemeriksaan Imunohistokimia pada Karsinoma Prostat

Karsinoma prostat adalah salah satu bentuk keganasan yang sering terjadi pada pria. Penyebab karsinoma prostat belum jelas, tetapi sampai prognosis kanker ini jelek. Seperti halnya pada keganasan yang lain, pada karsinoma prostat mempunyai petanda tumor, yaitu hormon *human chorionic gonadotropin* (HCG). Pada keadaan normal hormon ini didapatkan pada kehamilan. Petanda tumor HCG ini tidak spesifik untuk kanker prostat, sebab hormon ini dapat dijumpai pada kanker lain. Dengan demikian maka pemeriksaan HCG di jaringan akan lebih mempunyai arti untuk diagnosis daripada pemeriksaan di darah. Sebab pemeriksaan di jaringan atau di sel dapat secara langsung diketahui lokasi hormon tersebut.

Ada beberapa metode yang dapat dilakukan untuk menentukan HCG di jaringan, yaitu :

1. imunoperoksidase secara langsung atau tidak langsung;
2. radio immuno assay (RIA);
3. imunofluoresensi;
4. avidin biotin complex (ABC).

Teknik avidin biotin complex (ABC) ini merupakan teknik yang dikembangkan dari teknik imunoperoksidase. Teknik dianggap lebih peka dibanding dengan teknik imunoperoksidase yang konvensional.

#### III.5.1 Bahan dan prosedur pemeriksaan

##### a. Bahan

1. Sediaan aspirat berasal dari prostat;
2. Bahan fiksasi, yaitu linolin

3. Phosphat Buffer Saline (PBS) pH 7,4
 

R/ NaCl .....	85	gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	10,7	gr
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,9	gr
Aquadest .....	1000	cc
4. Hidrogen Peroksidase (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,3% dalam metanol
5. Anti HCG (Antibodi monoklonal)
6. Serum swine normal 3%
7. Biotinylated antibody
8. Larutan ABC (komplek AB)
9. 3,3 Diaminobenzidine (DAB) sebagai kromogen.
10. Hematoksilin
11. Alkohol asam
12. Amonia air
13. Alkohol 95% sampai alkohol absolut
14. Penjernihan dengan xilol
15. Mounting medium dengan Gliserol gelatin.

b. Alat

1. Mikroskop sinar;
2. Rotary mikrorom, bila aspiratnya berupa jaringan; atau cukup dihapuskan bila aspiratnya jaringan yang telah hancur;
3. Waterbath;
4. Inkubator;
5. Tempat pewarnaan;
7. Timer;
8. Gelas benda (*Obyek glass*);
9. Gelas penutup (*Cover glass*);
10. Pipet serologik;

## c. Prosedur pemeriksaan

## 1. Persiapan

## 1. Phospat Buffer Saline (PBS) pH 7,4

R/ NaCl .....	85	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	10,7	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	3,9	g
Aquadest .....	1000	ml

## 2. Hematoksilin

R/ Kristal Hematoksilin .....	5	g
Amonium/potasium alum .....	100	g
Asam merkuri merah .....	2,5	g
Alkohol absolut .....	50	ml
Aquadest .....	1000	ml

## 3. Alkohol asam

R/ Alkohol 70% .....	99	ml
HCl .....	1	ml

## 4. Amonia air

R/ NH <sub>4</sub> OH .....	2-3	ml
Aquadest .....	1000	ml

## 5. Larutan DAB

R/ 10 cc larutan AB (3 mg/ml dalam PBS)

## 6. Larutan ABC (kompleks AB)

avidin dalam PBS .....	10	g/ml
Biotin berlabel peroksidase dalam PBS	2,5	g/ml

## 2. Pewarnaan

1. Aspirat dihapuskan pada gelas benda;
2. segera difiksasi dengan fixatif, selama 14 menit;
3. celupkan sediaan kedalam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%, 30 menit;
4. cuci dengan PBS, 20 menit;
5. rendam dalam serum swine normal 3%, 20 menit;
6. tambahkan anti HCG, biarkan, 30 menit;
7. cuci dengan PBS, 2 kali 5 menit;
8. tambahkan larutan antibodi yang diberi biotin, selama 30 menit;
9. cuci dengan PBS, selama 2 x 5 menit;
10. tambahkan larutan kompleks AB, selama 30 - 60 menit;
11. cuci dengan PBS, 2 x 5 menit;
12. tambahkan larutan DAB, 5 menit;
13. cuci dengan air mengalir, 5 menit;
14. diwarnai dengan pewarna pembanding, yaitu hematoksilin dari Meyer, selama 1menit;
15. cuci dengan air mengalir;
16. dilakukan diferensiasi dengan alkohol asam, sampai sediaan agak pucat;
17. cuci dengan air mengalir sampai sediaan ke biruan;
18. celupkan dalam amonia air sampai sediaan tampak biru gelap;
19. sediaan dicuci dengan air mengalir;
20. dilakukan dehidrasi dengan menggunakan alkohol mulai 95% sampai alkohol absolut;
21. penjernihan dengan xilol;
22. diberi *mounting medium* dengan gliserol gelatin.

Sediaan yang telah diwarnai diperiksa dengan menggunakan mikroskop sinar. Sediaan yang positif, terlihat sitoplasma sel berwarna coklat dan inti berwarna ungu. Adanya warna ini menunjukkan bahwa di sel atau jaringan tersebut terdapat HCG. Sejak lima puluh tahun yang lalu, human chorionic gonadotropin (HCG) mulai dikenal sebagai petanda tumor. HCG merupakan hormon glikoprotein dengan BM 30.000, yang disusun oleh 15 - 20% karbohidat, yang terdiri dari galaktosa dan asam sialat. HCG memiliki banyak kemiripan dengan *Luteinizing Hormone* (LH) yang juga merupakan hormon glikoprotein dan memiliki struktur  $\alpha$  dan  $\beta$ . Hanya ada satu perbedaan yaitu HCG mempunyai gugus ekstra COOH di terminal struktur  $\alpha$ . Karena kemiripan ini sering terjadi reaksi silang antara anti HCG dengan LH. Reaksi silang ini jarang atau tidak terjadi bila pemeriksaan menggunakan anti  $\alpha$  HCG. Menurut Bidarf (1985), pada elektroforensis serum HCG normal merupakan fraksi  $\alpha$  dan  $\beta$  globulin. Sedangkan HCG yang didapatkan sebagai petanda tumor merupakan fraksi  $\beta$  dan  $\alpha$  globulin.

HCG di jaringan dapat diperiksa dengan metode Peroksidase Anti Peroksidase (PAP). Menurut Handoyo (1987), sekitar 75% peroksidase pada ikatan PAP hilang pada saat pencucian. Hal ini akan sangat mempengaruhi kepekaan pemeriksaan. Karena itu penggunaan metode avidin biotin peroxidase complex (ABC) akan jauh lebih peka.

Avidin sebenarnya merupakan derivat putih telur dengan BM 67.000 - 68.000 dalton. Sedang biotin adalah vitamin H yang didapatkan pada kuning telur. Avidin mempunyai 4 tempat ikatan yang luar biasa terhadap Biotin. Selain itu avidin dapat mengikat molekul seperti antibodi, enzim, lektin, dan sebagainya. Proses konjugasi dengan biotin disebut biotinisasi. Pada teknik ini

digunakan peroksidase sebagai konjugat. Biotin peroksidase dapat dibuat dari satu molekul peroksidase yang dilabel oleh beberapa molekul biotin. Dengan demikian maka molekul peroksidase tersebut akan diliputi oleh molekul biotin. Karena molekul biotin sangat kecil, maka molekul biotin ini tidak mengubah baik sifat fisik, kimia maupun kemampuan enzimatik peroksidase.

Kompleks avidin biotin peroksidase dapat dibuat dengan cara menginkubasi sejumlah avidin dan biotin peroksidase di tabung reaksi reaksi. Avidin bereaksi dengan biotin peroksidase dengan membentuk ikatan khusus pada *binding site*. Dengan perbandingan avidin dan biotin peroksidase sedemikian rupa sehingga tidak semua *binding site* pada molekul avidin terisi oleh biotin peroksidase. *Binding site* yang masih ada pada molekul avidin yang tidak mengikat biotin peroksidase, akan ditempati molekul biotin yang dikonjugasi dengan antibodi sekunder. Ikatan Avidin - Biotin jauh lebih stabil dibanding dengan ikatan Peroksidase Anti Peroksidase. Oleh karena itu metode ABC jauh lebih peka dari pada metode PAP. Pada penelitian terbukti bahwa ABC dapat mendeteksi antigen dalam jumlah yang sangat kecil yang tidak dapat dideteksi oleh metode PAP. Dengan demikian maka pemeriksaan HCG dengan menggunakan teknik ABC merupakan teknik yang relatif lebih peka dibanding dengan teknik imunoperoksidase yang ada. Namun mengingat HCG tidak hanya dijumpai pada kanker prostat, maka pemeriksaan HCG tidak spesifik untuk kanker prostat.

### III.6 Pemeriksaan Immunoperoksidase pada Kanker Payudara

Sebelum membicarakan pemeriksaan imunoperoksidase pada kanker payudara, akan diketengahkan lebih dahulu perihal kanker payudara. Hal ini diperlukan agar dapat dimengerti dasar pemeriksaan petanda tumor dengan menggunakan imunoperoksidase.

#### III.6.1 Kanker payudara

Kanker payudara merupakan keganasan yang banyak menyebabkan kematian pada wanita. Secara umum angka kematian kanker ini di Indonesia cukup tinggi, yaitu menempati urutan ke tiga di rumah sakit swasta atau menempati urutan angka kematian ke 6 di rumah sakit umum. Meningkatnya angka kematian kanker dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain :

1. pasien datang terlambat;
2. sarana diagnosis yang terbatas;
3. pengobatan yang masih perlu ditingkatkan.

Berbagai faktor resiko terkena kanker payudara, antara lain adalah :

#### a. Umur

Wanita diatas 30 tahun mempunyai kemungkinan yang besar untuk mendapatkan kanker payudara dan resiko akan bertambah setelah post menopause.

#### b. Riwayat keluarga

Wanita yang mempunyai keluarga yang menderita kanker mempunyai resiko yang lebih tinggi untuk menderita kanker payudara.

#### c. Riwayat menderita kanker

Wanita yang menderita kanker ditempat lain akan mempunyai

resiko untuk menderita kanker payudara lebih besar.

d. Status pernikahan

Wanita yang tidak menikah mempunyai resiko lebih besar untuk menderita kanker payudara.

e. Umur saat mempunyai anak pertama

Wanita yang melahirkan anak pertama pada umur 35 tahun, mempunyai resiko lebih tinggi untuk menderita kanker payudara.

f. Kelainan pada payudara

Wanita yang menderita kista atau sering mengalami infeksi pada payudara, akan lebih mudah menderita kanker payudara.

g. Umur menstruasi pertama

Wanita yang menstruasi pertama pada usia yang sangat muda, mempunyai resiko tinggi untuk menderita kanker payudara.

h. Penyinaran

Wanita yang sering mendapat penyinaran yang mengenai payudara, akan mempunyai resiko menderita kanker payudara yang lebih tinggi.

i. Obesitas

Wanita yang kegemukan akan mempunyai resiko mendapatkan kanker payudara yang lebih tinggi.

Kelainan jinak payudara yang dapat meningkatkan resiko kanker payudara, antara lain :

1. *Fibro cystic disease*, yang sering diderita oleh wanita berumur 30 - 45 tahun. Kelainan ini berkaitan dengan gangguan keseimbangan hormonal.
2. *Fibroadenoma*, yang dijumpai pada wanita muda dan diduga oleh tinggi kepekaan jaringan payudara terhadap hormon



estrogen.

3. *Fat necrosis*, merupakan kerusakan lemak pada payudara akibat trauma.
4. *Mammary Duct Ectopia*, merupakan pelebaran saluran air susu dibelakang papila.
5. *Mastitis*, yang merupakan peradangan di jaringan payudara yang dapat terjadi pada semua umur.

### III.6.2 Petanda tumor *Carcinoembryonic Antigen* (CEA)

*Carcinoembryonic antigen* (CEA) merupakan petanda tumor, karena bahan ini akan meningkat kadarnya pada penderita kanker. Secara normal bahan ini disintesis oleh sel embryonal. CEA juga merupakan suatu glikoprotein dengan berat molekul 200.000. Pertama kali CEA ditemukan oleh Gold dan Thomson pada penderita kanker kolon, karena itu pada awalnya CEA dianggap spesifik untuk karsinoma kolon. Pada berbagai pemeriksaan kemudian diketahui ternyata CEA ini juga terdapat pada karsinoma payudara. Kadar CEA pada orang dewasa normal kurang dari 2,5 ng/ml darah. Pada kanker kadar ini meningkat. Dengan demikian maka CEA digunakan sebagai petanda kanker pada payudara.

### III.6.3 Metoda Imunoperoksidase

Teknik imunoperoksidase *carcinoembryonic antigen* (CEA) digunakan untuk menggantikan pemeriksaan imunofluoresensi. Teknik imunofluoresensi ini mempunyai banyak kendala, antara lain memerlukan mikroskop khusus, preparat tidak permanen sehingga sulit untuk disimpan lama karena kadar fluoresensinya menurun, selain

itu teknik imunofluoresensi sering menimbulkan otofluoresensi, teknik ini memerlukan jaringan segar, dan morfologi yang didapat jelek. Dengan ditemukan pemeriksaan imunoperoksidase, maka kendala pemeriksaan tersebut dapat dikurangi.

Metode imunoperoksidase sudah dimulai sejak tahun 1966, dan metode ini mempunyai beberapa keuntungan, antara lain dapat menggunakan mikroskop sinar, preparat tetapi permanen sehingga dapat disimpan, dapat menggunakan preparat parafin, dan morfologi yang didapat lebih bagus.

#### III.6.4 Bahan dan prosedur kerja

##### a. Bahan

Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan petanda tumor CEA pada kanker payudara, adalah :

1. Jaringan hasil biopsi atau operasi tumor payudara
2. xilol,
3. alkohol absolut, alkohol 95 %,
4. bahan *mounting*,
5. HCl 0,2% dalam metanol (*blocking agent*),
6. antibodi primer untuk CEA, diperoleh dari kelinci yang diberi antigen sebelumnya,
7. antibodi kontrol, diperoleh dari serum kelinci normal,
8. antibodi sekunder, yaitu anti  $\gamma$  globulin kelinci yang diperoleh dari serum angsa,
9. kompleks Peroksidase Anti Peroksidase (PAP), substrat  $H_2O_2$  3% dan kromogen Diamino benzinidin tetrahydroclorid (DAB),

10. Tris Buffer pH 7,6
11. perekat jaringan yaitu gliserin atau albumin
12. warna pembanding Hematoksilin dari Mayer,
13. alkohol asam yang terdiri dari alkohol 70 % 99 ml dan HCl paket 1 ml,
14. amonium air yang berisi amonium hidroksida 2 ml dan air suling 1000 ml.

b. Alat

1. Mikroskop sinar;
2. Mikrorom putar;
3. Waterbath;
4. Inkubator;
5. Tempat pewarnaan dan pencucian;
7. Pencatat waktu;
8. Gelas benda (*Obyek glass*);
9. Gelas penutup (*Cover glass*);
10. Pipet serologik;
11. Kertas saring;
12. gelas ukur 1000 ml.

c. Prosedur pemeriksaan

1. Persiapan

Persiapan jaringan ini ada dua hal yang harus dilakukan, yaitu pemberian label dan fiksasi.

1. Fiksasi jaringan dengan formaldehid 4% dalam NaCl 0,15 molar selama 2 - 4 jam,

2. pemberian label dilakukan untuk menghindari agar tidak tertukar dengan sediaan lain.

Mengingat CEA merupakan petanda yang tidak rusak oleh pemrosesan jaringan, maka sediaan dapat diproses dengan menggunakan teknik parafin. Teknik tersebut sebagai berikut :

1. dehidrasi dengan alkohol dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi selama 3 x 2 menit;
2. penjernihan dengan xilol, selama 3 x 2 menit;
3. impregnasi, yaitu proses untuk mengusahakan menghomogenkan sediaan, yang dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam parafin cair pada suhu 56 - 58 ° C, selama 3 x 2 jam;
4. pengeblokan jaringan dengan menggunakan parafin, yang dicetak sesuai dengan kebutuhan;
5. setelah terbentuk balok parafin, selanjutnya dilakukan pemotongan balok parafin yang berisi jaringan dengan menggunakan mikrotom putar, dengan ketebalan antara 4 - 6  $\mu$ .
6. Irisan balok parafin yang berisi jaringan diletakkan pada gelas benda.

## 2. Pewarnaan CEA dengan Teknik PAP

1. Jaringan parafin yang telah dilekatkan pada gelas benda, dituangi larutan tripsin 0,1 % dengan pH 7,8 pada suhu 37°C selama 20 - 25 menit;
2. cuci dengan Tris buffer yang mengalir,
3. peroksidase endogen dirusak aktifitasnya dengan mencelupkan ke larutan HCl 0,2 % dalam metanol pada suhu kamar, selama 30 menit;
4. cuci dengan Tris buffer;
5. bila terdapat latar belakang yang tidak spesifik, dapat dihilangkan dengan menggunakan serum angsa normal (1 : 5), pada suhu kamar, selama 10 menit;
6. cuci dengan Tris buffer;
7. bila terdapat reaksi silang antigen yang tidak spesifik dapat dihilangkan dengan menggunakan asam perklorat;
8. cuci lagi dengan Tris buffer,
9. inkubasi dengan antibodi primer, yaitu anti CEA dari serum kelinci, pada suhu kamar, selama 30 menit;
10. cuci dengan Tris buffer;
11. inkubasi dengan antibodi sekunder, yaitu anti  $\gamma$  globulin kelinci dari serum angsa, pada suhu kamar, selama 30 menit;
12. cuci dengan Tris buffer;
13. inkubasi dengan kompleks PAP, pada suhu kamar, selama 30;
14. cuci dengan Tris buffer;

15. berikan substrat yang mengandung kromogen, pada suhu kamar, selama 5 - 10 menit;
16. cuci dengan Tris buffer;
17. berikan warna pembanding, yaitu hematoksilin dari Mayer;
18. dehidrasi dengan :
  1. alkohol 95 %, selama 2 x 2 menit;
  2. alkohol absolut, selama 3 x 2 menit;
19. penjernihan dengan xilol, selama 3 x 2 menit,
20. dilakukan *mounting* dengan canada balsam;
21. sediaan siap untuk dilihat dengan mikroskop sinar.

Pada keadaan normal *carcinoembryonic antigen* atau CEA dapat ditemukan di kolon. Pada penderita kanker, termasuk kanker payudara, kadarnya CEA meningkat. Untuk mendeteksi CEA ini dapat menggunakan teknik Peroksidase Anti Peroksidase (PAP). Selanjutnya untuk memeriksa keganasan, selain diperlukan pemeriksaan histopatologi, maka juga diperlukan pewarnaan khusus dari petanda tumor, seperti berbagai macam produksi sel, antara lain enzim dan hormon, atau antigen sel kanker.

Walaupun pemeriksaan sel kanker sudah lama dilakukan, yaitu sejak Coons merintis suatu pemeriksaan dengan metode imunofluoresens pada tahun 1941, tapi karena berbagai kendala yang dihadapi, maka teknik pemeriksaan tersebut tidak berkembang dengan pesat. Dengan diperkenalkannya metoda lain, yaitu immunoperoxidase kendala tersebut dapat diatasi. Dasar pemikirannya sederhana, yaitu mengubah label yang memberi pendaran ke bentuk label yang berupa perubahan warna yang dapat dilihat dengan mikroskop sinar.

Teknik PAP yang menggunakan jaringan sebagai bahan pemeriksaan, sering dijumpai adanya peroksidase endogen yang dapat mengganggu pemeriksaan. Untuk menghilangkan gangguan ini dapat dilakukan penambahan larutan HCl 0,2 % dalam metanol. Hasil akhir pewarnaan PAP ini menunjukkan warna coklat di tempat yang mengandung CEA. Warna tersebut ditimbul oleh perubahan substrat DAB oleh enzim peroksidase. Metode Peroksidase Anti Peroksidase (PAP) banyak digunakan untuk pemeriksaan *carcinoembryonic antigen* (CEA) pada kanker payudara, karena metoda ini lebih praktis dan relatif lebih mudah dilaksanakan dibanding dengan metode imunoflouresensi. Selain itu pemeriksaan ini mempunyai spesifisitas yang lebih tinggi dari metode histopatologik rutin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bagshawe KD, 1969. Chorionicarcoma, The Clinical Biology of the Trophoblast and Its Tumours. Edward Arnold Ltd, First Edition, London, pp 153 - 163.
- Bidart JM, et al, 1985. Identification of Epitopes Associated with HCG and The B HCG Carboxyl Terminus by Monoclonal Antibodies Produced Against A Synthetic Peptide. The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, vol 134, 1, pp 157-164.
- Charles W, Parker, 1980. Oncofetal Antigen. Clinical Immunology vol 1, pp 450 - 459.
- Coggi G, Dell OP, Viale G, 1987. Avidin Biotin Methods. In Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications. Edited by Julia M Polak, Susan Van Noorden, Second edition, JW Arrowsmith Ltd, Bristol, pp 56 - 59.
- Gray, Dowling R, Hill R, Payne RW, Windsor, 1984. Demonstration of Carcinoembryonic antigen Bone Marrow from patients with Carcinoma ; J Clin Pathol, 37, pp 1090 - 94.
- Handojo I, 1987. Uji Peroxidase Anti Peroxidase pada Tuberkulosis. Disertasi, Fakultas Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya, pp 78 - 85.



- Heyderman EA, Breda ME, Richardson TC, 1984. Epithelial Markers in Prostatic, Bladder and Colorectal Cancer, an Immunoperoxidase Study of Epithelial Membrane Antigen Carcinoembryonic Antigen and Prostatic Acid Phosphate, from the Department of Histopathology St Thomas Hospital, London, J Clin Pathol 1984, 37, pp 1363 - 1369.
- Hoediasmoro DS, 1983. Morfologi Limfoma Maligna Non-Hodgkin Kelenjar Getah Bening Leher di Surabaya dan Sekitarnya. Disertasi, hal 130 - 195.
- HSU SM, et al, 1981. A Comparative study of the Peroxidase Anti Peroxidase Methods and an Avidin Biotin Complex for Studying Polypeptide Hormons with radio Immuno Assay Antibodies. American Journal of Clinical Pathologist, vol 75, 5, pp 734 - 738.
- Irwan S, Juwianto, Siswanto, D, 1987. Pemeriksaan Petanda Tumor pada Proses Keganasan. Lokakarya Perkembangan Petanda Tumor ditinjau dari Aspek Laboratorik, Surabaya, hal 1-8.
- Iwa N, et al, 1988. Immunocytochemical Demonstration of Glial Fibrillary ACidic Protein in Imprint Smears of Human Brain Tumours. Diagnostic Cytopathology, Allan R Liss, vol 4, 1, pp 74 - 75.
- Javapour N, 1980. The Role of Biologic Tumor Markers in Testicular Cancer. Cancer, 45, pp 1755 - 1761.

- Kawagoe K, et al, 1978. Ultrastructural Evidence of Human Chorionic Gonadotropin on Trophoblastic Surface. ACTA Histochemiaca et Cytochemiaca, Official Journal of the Japan Society of Histochemistry and Cytochemistry, vol 11, 2, pp 187 - 193.
- Kresno SB, 1984. Carcinoembryonic Antigen (CEA). Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. Jakarta.
- Kitajima K, et al, 1983. Double Staining of Indirect Immunoperoxidase Method for HCG and AFP in the Human Testicular Tumor. ACTA Histochemiaca et Cytochemiaca Departement of Urology, Nihon University School Of Medicine, Tokyo, vol 16, 2, pp 148 - 153.
- Kurman RJ, Scardino PT, McIntire KR, Waldann TA, Javadpour N, 1977. Cellular Localization of Alfa Feto Protein and Human Chorionic Gonadotropin in Germ Cell Tumors of the Testis Using An Indirect Immunoperoxidase Technique. Cancer, 40, pp 2136 - 2151.
- Li CY, 1978. Histochemical And Immunohistochemical Study of Diffuse Large-Cell Lymphomas. Am Jour Clinical Pathology, Vol 70, Oct - Des, p 721.
- Luna LG, 1968. Manual of Histologic Staining Methods of The Armed Forces Institute of Patholog. 3 rd edition Mac Graw-Hill Compay, Ney York.
- Manifold IH, Bishop FM, Cloke P, Triger DR, 1982. Lysozyme in chronic liver disease : a biochemical and histological study. Jour Clinical Pathology, pp 815-819.

- Marshall RJ, Herbert A, Bray SG, Jones DB, 1984. Use of Antibodies to Carcinoembryonic Antigen and Human Milk fat Globule to distinguish Carcinoma Mesothelioma, and Reactive Mesothelium, from the University Departement of Histopathologi, Southampton General Hospital, J Clin Pathol, 37, pp 1215 - 21.
- Michael OJ, Norman Z, Burke BD, 1981. Immunocytochemical Localization of Carcinoembryonic Antigen in Benign and Malignant Colorectal Tissue, Massachusetts, America Society of Clinical pathologist, March, pp 283-289.
- Michael W, Merris MS and Frederik R, 1975. Immunologic and Histochemical Properties of Histiocytic and Mixed Histiocytic-Lymphocytic Lymphomas. Am Jour Clinical Pathology, Vol 63, Jan - Mar, pp 403 - 413.
- Nalestik, Michael A, MD and Rabin, Bruce S. A Comparison of Indirect Immunofluorescen and the Avidin - Biotin Peroxidase Conjugate Technic (ABC) in the Performance of the Antinuclear Antibody Test, American J Clin Pathol, 81 (2), Februari 1984, pp 192 - 97.
- Nanba KMN, Elaine S, Soban BT, Berard MD, 1977. Alkaline Phosphatase Positive Malignant Lymphoma. Am Jour Clinical Pathology, Oct, Vol 64, pp 442 - 536.
- Necille M, 1981. Carcinoembryonic Antigen the Current Status Arch Pathol Lab Med - vol 105, pp 281 - 282.
- Notopuro PH, Soetamto W, Sutrisno A, 1987. Pemantauan Kadar CEA pada Kasus - kasus Karsinoma Kolorectal, Lokakarya Perkembangan Petanda Tumor ditinjau dari Aspek Laboratorik, Surabaya, hal 1-5.

- Palute MM, David J, Patt MD, Robert WPD, Chandra VMD and Pamela M, 1977. T-Cell Leukemia-Lymphoma in Young Adults. Am Jour Clinical Pathology, Oct, Vol 64, pp 429 - 438.
- Pascual Rafael S, Gee J, Bernard L, Finch SC, 1973. Use fulnes of serum lysozyme measurment in diagnosis and evaluation of sarcoi-  
dosis. Journal of Medicine, The New England.
- Poninh BF, et al, 1965. Focal Microscopic Lesions Resembling Adenocarcinoma of the Prostate. The Bulletin of the Tulane Uni-  
versity Medical Faculty, vol 24, 4, pp 307.
- Putra ST, 1988. Pemeriksaan Reseptor Estrogen secara Imunositoki-  
mia. Penataran Teknisi Kesehatan VI FNGK, Surabaya, pp 125-133.
- Stites DP, et al, 1982. Oncodevelopmental Tumor Antigens. Basic  
and Clinical Immunology 4 th ed, p 236.
- Taylor CR, Phild D, Path MRC, 1986. A Diasnostic Tool for the  
Surgical Pathologist. Immunomicroscopy. WB Saunders Company,  
Philadelphia.
- Thomson RA, 1981. Immunoflourecence and Immunoperoxidase Tech-  
niques. Techniques in Clinical Immunology, 2 nd ed, pp 106 - 135.
- Thor Ann, 1987. Monoclonal Antibodies and Immunopathology :  
Application to Human Carcinomas. In Tumor Markers and Tumor  
Associated Antigen. Adited by Bimal Ghost, Luna Ghost, MC Graw-  
Hill Book Company, Singapore, pp 138 - 143.

Tjuandra W, 1989. Immunoperoxidase : Principle Technique Application, and a Case Report. DEXA Media, 2:3-7.

Walker RA, 1980. Demonstration of Carcinoembryonic Antigen in Human Breast Carcinomas by The Immunoperoxidase Techniques. Jour Clin Pathol 33, pp 356 - 360.



