

## LAMPIRAN 1

Cara pengambilan dan pemrosesan bahan pemeriksaan :

### 1. Fiksasi

Bahan sediaan jaringan hasil operasi/biopsi dimasukkan dalam larutan fiksasi. Larutan fiksasi yang digunakan adalah larutan 10% formalin. Jangka waktu fiksasi untuk bahan jaringan operasi 18 - 24 jam dan untuk jaringan biopsi 4 - 6 jam pada suhu kamar. Setelah difiksasi dilakukan potongan-potongan kecil pada jaringan yang akan diperiksa, dengan ukuran 1,5 x 1,5 cm dan tebal maksimal 5 mm. Selanjutnya dicelupkan/dicuci ke dalam aquades selama 1 jam. Kemudian dilakukan pemotongan.

### 2. Pengolahan jaringan/pemrosesan jaringan

Dalam pengolahan jaringan pada penelitian ini menggunakan alat automatic yaitu autotechnicon Reichert Yung type HistokeNette 2000

Langkah-langkah pada pemrosesan tersebut :

#### 2.1 Proses Dehidrasi

Pada proses ini digunakan alkohol dengan konsentrasi meningkat atau dari kadar rendah sampai kadar tinggi. Proses dehidrasi ini dimulai perendaman jaringan dalam larutan alkohol 70% selama 2 jam, alkohol 80% selama 2 jam, alkohol 96% selama 2 jam, alkohol 96% selama 1 jam dan alkohol 100% atau alkohol absolut selama 1 jam.

2.2 Proses Clearing (penjernihan). Berguna untuk membuat jaringan menjadi jernih dan transparan, dalam proses ini digunakan Xylol yang meliputi perendaman jaringan dalam larutan, alkohol dicampur dengan Xylol perbandingan 1 : 1 selama 1 jam dan larutan Xylol murni selama 2 jam kemudian Xylol lagi selama 2 jam.

2.3 Proses Impregnasi, berguna untuk mengisi pori-pori atau raongga dalam sel/jaringan dengan bahan yang keras agar jaringan dapat dipotong tipis tanpa mengalami kerusakan morfologis. Proses ini dilakukan dengan merendam jaringan dalam parafin cair dengan suhu 56 - 58 ° C selama 2 x 2 jam (2 parafin).

#### 2.4 Proses pengeraman atau Embedding

Setelah diproses dalam autotechnicon maka potongan-potongan jaringan harus diblok dengan bahan yang cukup keras agar jaringan dapat dipotong tipis (4 - 6) mikron tanpa menimbulkan kerusakan morfologis

Bahan proses yang digunakan sama dengan bahan yang digunakan pada proses impregnasi yakni parafin solid yang dicairkan pada suhu 56 - 58° C. Potongan mikrotome, setelah proses embedding, jaringan dipotong dengan tebal 4 - 6 mikron dengan, menggunakan mikrotome Rotary Type AO-820. Potongan jaringan diletakkan pada gelas obyek yang sudah diolesi dengan polyisin sebagai bahan perekat. Selanjutnya hasil potongan yang terdapat pada gelas obyek yang dimasukkan

dalam inkubator dengan suhu 56 - 58<sup>0</sup> C selama 1 - 2 jam. Kemudian dikeluarkan/didinginkan selama kira-kira 15 sampai 30 menit untuk selanjutnya dilakukan dipparafinisasi dan rehidrasi.

## 2.5 Dipparafinisasi/rehidrasi/pewarnaan jaringan yang menggunakan Mayer's Hematoksilin-Eosin.

1	Xylol I	5 menit
2	Xylol II	5 menit
3	Xylol III	5 menit
4	Alkohol absolut I	2 menit
5	Alkohol absolut II	2 menit
6	Alkohol absolut III	2 menit
7	Air mengalir	5 menit
8	H.E/Hematoksilin	5 menit
9	Air mengalir	10 menit
10	Alkohol asam	2-3 celup
11	Air mengalir	5 menit
12	Litium karbonat	2 menit
13	Air mengalir	5 menit
14	Eosin	1 menit
15	Alkohol absolut I	2 menit
16	Alkohol absolut II	2 menit
17	Alkohol absolut III	2 menit
18	Xylol I	5 menit
19	Xylol II	5 menit
20	Xylol III	5 menit
21	Tutup cover gelas dengan menggunakan entelan	

### 3. Pewarnaan Immunohistokimia

Agar dapat dilakukan pengecatan dengan antibodi, jaringan harus terbebas dari parafin. Jaringan dimasukkan dalam Xylool selama 3 x 15 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam alkohol 100% selama 2 x 2 menit untuk melarutkan Xylool, dan dilakukan rehidrasi dengan alkohol 98% selama 2 x 2 menit kemudian alkohol 80% selama 5 menit. Kemudian dimasukkan dalam aquades, sediaan selanjutnya dibilas dengan PBS (Phosphat Buffered Saline). Selanjutnya sediaan siap dilakukan pemeriksaan histokimia. Dalam penelitian ini menggunakan antibodi monoklonal Er - D5 Anti Human Code No. M7047 dari dacopath.

## Lampiran 2

Bahan-bahan fiksasi dan penggunaannya.

Method	Useful for
Fresh frozen tissue Cryostat sections, unfixed or postfixed in alcohol acetone Freeze-dried, parafin sections, postfixed in acetone Smears, impressions, unfixed or fixed in alcohol or acetone	Extracellular antigen, e.g. immunoglobulin in glomerular basement membrane Cell surface antigens; tissue antigens for diagnosis of autoimmune disease
Cryostat sections of tissue prefixed by perfusion or immersion in buffered formaldehyde or buffered p-benzoquinone (NB Alternation of temperature or Ph may improve fixation)	Peptides in endocrine cells and nerves  Antimes, enzymes (as antigens) etc.
Freeze-drying followed by vapour-fixation in formaldehyde, p-benzoquinone, diethyl pyrocarbonate and embedding in parafin	Intracellular water-soluble antigen peptides in endocrine cells (not suitable for membrane antigen)
Rinse in saline, alcohol fixation, parafin embedding	Immune deposits and intracellular immunoglobulins
Buffered formalin, formol saline, formol mercury, Bouin's fixative etc. Routine surgical material, parafin sections (dried at 37°C) May be treatment with a protease before use	Histopathological diagnosis; peptide hormones, immunoglobulin etc
Periodate-lysine-paraformaldehyde	Glycoproteins
Glutaraldehyde lysine-paraformaldehyde	Electron microscopical immunocytochemistry

(Noorden, 1986)

### LAMPIRAN 3

#### Pemeriksaan Immunohistokimia dengan metode avidin biotin complex

##### 1. Persiapan jaringan.

Sediaan yang diwarnai dapat berasal dari sediaan segar dan sediaan blok parafin. Kedua jenis sediaan memerlukan persiapan perlakuan yang berbeda.

##### a. Fiksasi

Pilihan larutan fiksasi dan penatalaksanaan jaringan untuk metode avidin biotin complex mengikuti kriteria yang sama yang diadaptasi dari teknik immunohistokimia konvensional. Untuk jaringan kanker payudara, larutan fiksasi yang dipilih adalah buffer formalin 10%.

##### b. Larutan penyanggah (buffer)

Antibodi baik yang ditempel biotin maupun tidak dan fluorochrome yang dilabeli avidin dilarutkan dalam 0,01 M, phosphate buffered saline (PBS) dalam pH 7,6 atau dalam 0,05 M. Tris buffered saline (TRIS) pH 7,6 yang berisi 0,02% bovin serum albumin dan 0,01 sodium azide.

Peroksidasi yang dilabel dengan avidin dan avidin biotin complex dilarutkan dalam larutan penyanggah yang sama tanpa azide.

c. Prosedur penanganan potongan jaringan sebelum pewarnaan immunohistokimia.

I. Potongan jaringan segar yang belum difiksasi

1. Jaringan dikeringkan selama 30 menit, pada suhu kamar.
2. Kemudian difiksasi secukupnya.
3. Dimasukkan dalam air
4. Bila perlu dapat dilakukan dengan pengeblokan peroksidase endogen.

II. Potongan dengan pengeraman parafin (blok parafin)

1. Diparafinisasi dengan Xylol
2. Rehidrasi bertahap dalam alkohol sampai ke air murni
3. Bila perlu, dihilangkan pigmen merkuri
4. Bila perlu, dilakukan pengeblokan peroksidase endogen

d. Pengeblokan peroksidase endogen

1. Sediaan diberi 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> selama 5 menit.
2. Cuci dalam air mengalir selama 5 menit
3. Cuci dalam air murni selama 3 menit
4. Pindahkan ke dalam larutan buffer (PBS atau TRS) selama 5 menit

### III. Metode pewarnaan Avidin Biotin (tidak langsung) Fluoresensi dan Peroksidase

1. PBS (TBS) selama 5 menit
2. Serum normal (dari spesies yang sama sebagai antibodi terlabel biotin selama 15 menit
3. Dilarutkan cepat dengan anti serum primer, selama 30 menit sampai 2 jam pada suhu kamar, atau semalam pada suhu 4 ° C.
4. Bilas dengan PBS atau TRS, 3 kali, masing-masing 5 menit.
5. Antibodi sekunder dilabel dengan biotin, selama 30 menit, pada suhu kamar.
6. Bilas seperti pada langkah nomor 4.

Untuk Fluoresensi dilanjutkan :

7. Fluorescein isothiocyanate (FITC) atau tetramethyl cholamine isothiocyanate (TRITC) dilabel dengan avidin, selama 30 menit pada suhu kamar
8. Bilas seperti langkah nomor 4
9. Diberi substrat kromogen

Untuk peroksidase dilanjutkan :

7. Diberi peroksidase terlabel avidin, 30 menit pada suhu kamar
8. Bilas seperti langkah nomor 4.
9. Diberi substrat kromogen
10. Mounting dengan media yang sesuai



IV. Metode pewarnaan tidak langsung Avidin - Biotin Complex seperti halnya pada metode avidin terlabel (untuk peroksidase) hingga langkah nomor 6, kemudian dilanjutkan sebagai berikut :

7. Persiapan Avidin - Biotin Complex, selama 30 menit, pada suhu kamar, campurkan 10 mikro liter bio tynylated peroksidase dalam 1 ml buffer (vector vectastain atau gunakan strap avidin biotinylated peroksidase complex 1 : 200 (amersham).
8. Masukkan dalam PBS/TBS, 3 kali, masing-masing 5 menit
9. Beri substrat kromogen
10. Mounting dengan bahan yang sesuai

V. Pembuatan Media :

a. PBS (Phospat Buffered Saline)

NaCl                      87,5 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      1,92 gr

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O                      15,33 gr

Masing-masing dilarutkan dalam aquades. Dari masing masing larutan dicampurkan dan ditambahkan dengan aquades sampai 800 ml, kemudian diaduk-aduk sampai rata selanjutnya ditambah aquades sampai 1000 ml.

Keterangan :

PBS ini mempunyai kekuatan 10 kali, jadi kalau membuat PBS siap pakai harus diencerkan dulu 10 kali yaitu 100 ml larutan PBS yang mempunyai kekuatan 10 kali ditambah 900 ml aquades

b. Tris Buffer

Tris 1,21 gr ditambah 170 ml aquades, lalu ditambah HCl 1 N sampai pH 7,6. Setelah pH 7,6 ditambah aquades lagi mencapai 200 ml.

Cara membuat HCl 1 N :

1,25 ml HCl 25% ditambah 6,75 ml aquades kemudian diaduk sampai rata atau larut.

c. Larutan D.A.B (Diamino Benzidine)

1 tablet DAB sama dengan 10 mg DAB

1 tablet DAB ditambah 10 ml larutan tris pH 7,6 kemudian diaduk sampai larut, lalu ditambah 10 mikro liter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%

d. Larutan PBS + 1% BSA

BSA yang tersedia adalah 20% BSA sama dengan 200 grol per liter BSA. Jadi membuat BSA 1% sebanyak 10 ml adalah

$$X = 10 / 20 = 0,5$$

$$X = 0,5$$

Jadi BSA 20% diambil 0,5 ml ditambah dengan 9,5 ml PBS sama dengan 10 ml PBS 1%. Untuk antibodi sekunder dan strepavidin diencerkan dengan PBS + 1% BSA.

Caranya :

Ambil 9,75 ml PBS kemudian ditambah 0,25 ml BSA 1% maka sama dengan PBS + BSA 1%.

e. Larutan PBS + 0,5% BSA

BSA 1% yang tersedia diambil 5 ml ditambah 5 ml PBS maka sama dengan 10 ml BSA 0,5%

Keterangan :

Untuk mengencerkan antibodi dengan PBS + BSA 0,5%

Caranya :

Ambil 9,75 ml PBS + 0,25 ml BSA 0,5% sama dengan PBS + BSA 0,5%

f. Larutan Bloking

Ambil 80 ml metanol ditambah 0,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%

Keterangan :

Untuk membuat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% adalah kita ambil 9 ml aquades lalu ditambah 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

g. Larutan Pepsin

Caranya :

20 ml pepsin ditambah 4950 mikro liter aquades dilarutkan dulu,  
baru ditambah 1 N HCl.

Membuat larutan HCl 1 N sebanyak 10 ml. 1,25 ml HCl 25%  
ditambah 8,75 ml aquades dicampur sampai larut.

h. Larutan Buffer Sitrat

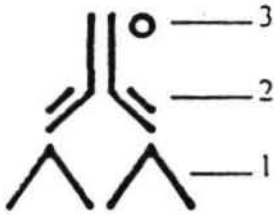
Caranya :

Cetric acid ditambah 2,1 gr

LAMPIRAN 4

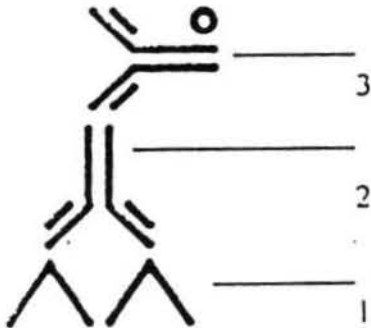
Ilustrasi Metode pewarnaan Imunohistokimia

I. Metode Langsung (direk)



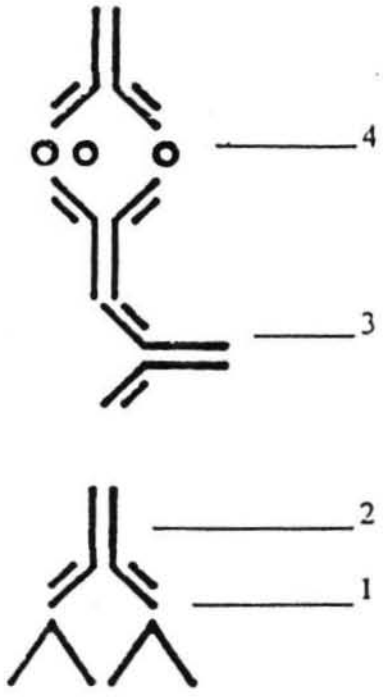
- 1. Antigen jaringan
- 2. Antibodi
- 3. Label enzim

II. Metode Tidak Langsung (indirek)



- 1. Antigen jaringan
- 2. Antibodi Primer
- 3. Antibodi sekunder yang dilabel Enzim

III. Metode Peroxydase Anti Peroxidase (PAP)

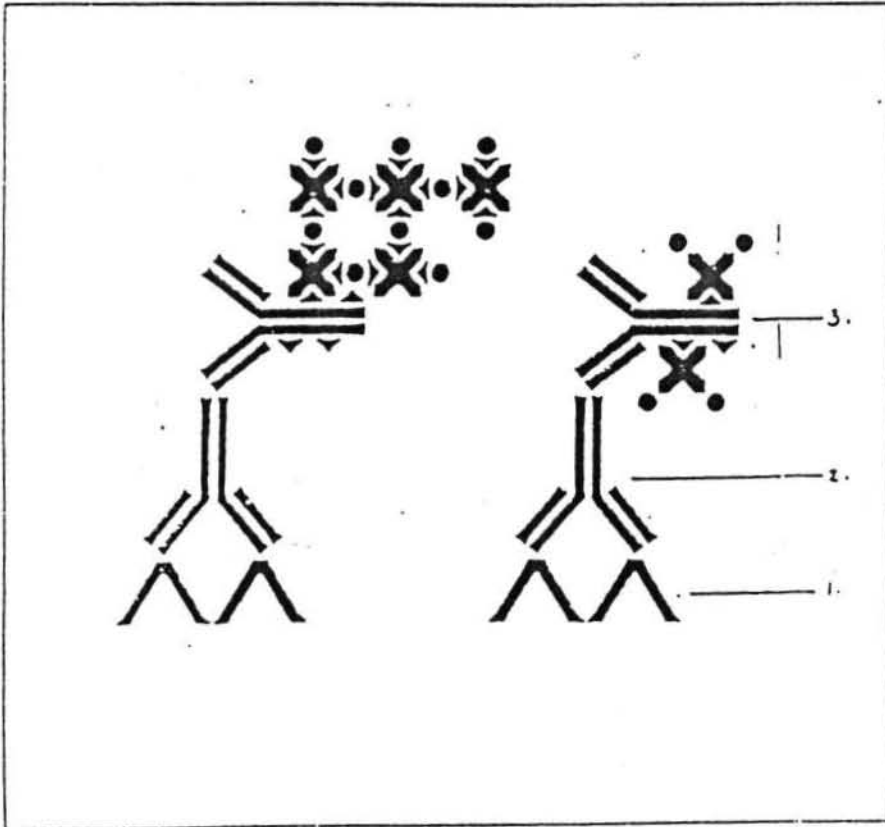


- 1. Antigen jaringan.
- 2. Antibodi primer
- 3. Antibodi panghubung
- 4. Kompleks PAP

IV. Metode Avidin - Biotin

ABC METHOD

LAB METHOD



- 1. Antigen jaringan
- 2. Antibodi primer
- 3. Antibodi yang dilabel biotin.

## Lampiran 5

Data hasil pemeriksaan estrogen reseptor kelompok kontrol (non mikrowave) dan perlakuan (mikrowave)

No Sediaan	Kontrol (tanpa mikrowave)	Perlakuan (mikrowave)
1	50	68
2	45	64
3	46	68
4	56	78
5	65	78
6	45	65
7	65	81
8	58	78
9	43	68
10	48	67
11	50	76
12	56	77
13	48	71
14	54	75
15	44	68
16	46	74
17	49	62
18	40	66
19	45	63
20	64	66
21	46	69
22	54	71
23	53	68
24	46	62
25	53	71
26	42	67
27	52	81
28	61	74
29	68	79
30	53	72
31	48	62
32	53	72
33	42	61

Lampiran 6

Uji Normalitas untuk kontrol (tanpa microwave)

Test distribution - Normal    Mean: 51.45  
 Standard Deviation: 7.07

Cases: 33

Most extreme differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-Tailed P
.12694	.12694	-.09061	.7292	.6622

Uji Normalitas untuk Perlakuan (microwave)

Test distribution - Normal    Mean: 70.94  
 Standard Deviation: 6.38

Cases: 33

Most extreme differences

Absolute	Positive	Negative	K-S Z	2-Tailed P
.10431	.10431	-.05958	.5992	.8653

Number of Variable	2-tail pairs	Corr	Sig	Mean	SD	SE of Mean
	33	.798	.000	51.4545	7.071	1.231
				70.9394	6.378	1.110

Paired Differences "

Mean	SD	SE of Mean "	t-value	df	2-tail Sig
-19.4848	4.345	.756 "	-25.76	32	.000
95% CI (-21.026, -17.944) "					

