

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

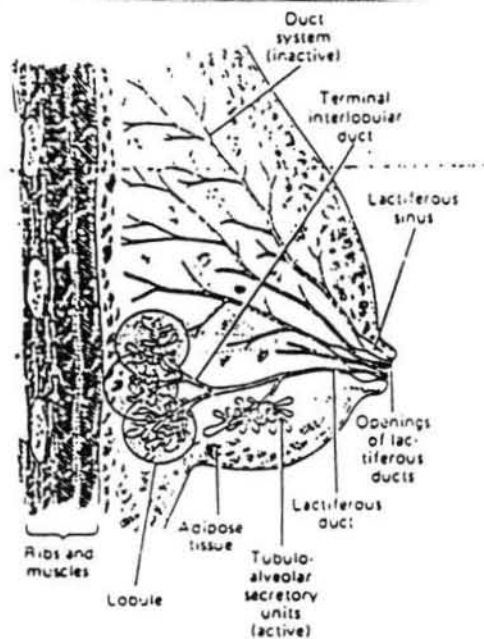
#### 2.1 Tinjauan Anatomi dan Histologi Payudara

Secara embriologik payudara manusia berasal dari penebalan ektodermal pada sisi pektoral dari aksila ke arah vulva pada kedua sisinya. Penebalan bilateral ini timbul pada minggu keenam kehidupan mudigah. Pada minggu kesembilan, penebalan ini menjadi atrofi kecuali pada daerah pektoral dan puncak puting nampak masa proliferasi sel basal.

Akhir bulan ketiga gestasi, sel skuamosa dari permukaan mulai invasi ke puncak puting. Saluran payudara tumbuh berasal dari daerah ini dan berakhir pada puncak lobular, dan terjadinya proliferasi ke asini sering dengan maturitas seksual. Kelenjar payudara dewasa terletak di antara lapisan luar dan dalam fasia pektoralis superfisial dinding dada depan, berada pada celah iga depan kedua sampai ketujuh. Dimensi kepala ekor antara 10-12 cm dan ketebalan kelenjar maksimum 3-5 cm. Payudara non-laktasi mempunyai berat 150-200 gram dan kelenjar yang mengalami laktasi mempunyai berat 400-500 gram (Spatt JS *and* Tobin GR., 1988).

Payudara merupakan kelenjar tuboalveolar terdiri atas 15-25 lobus yang berfungsi mengeluarkan air susu. Setiap lobus terpisah oleh jaringan ikat padat dan banyak jaringan lemak yang sesungguhnya merupakan kelenjar itu sendiri dengan saluran laktiferus ekskretorius. Saluran ini mempunyai panjang

2-4,5 cm yang bermuara pada puting payudara, terdapat 15-25 muara dan setiap muara berdiameter 0,5 mm. Susunan histologik kelenjar payudara beragam sesuai jenis kelamin, umur, dan keadaan fisiologinya (Spatt JS and Tobin GR.,1998).



Gambar 2.1: Gambaran skematik payudara wanita menunjukkan kelenjar mamma dengan muara dalam puting susu. Di sini diperlihatkan jaringan kelenjar payudara (Basic Histology, ed 7.,1992).

### 2.1.1 Struktur payudara pada pubertas dan dewasa

Sebelum pubertas kelenjar payudara tersusun dari sinus laktiferus dan beberapa cabangnya yaitu saluran duktus laktiferus. Perkembangan kelenjar payudara wanita selama pubertas merupakan salah satu karakteristik seks sekunder. Selama periode ini, payudara tumbuh baik dalam ukuran maupun

perkembangan penonjolan puting susu, sedang pada pria payudara normal menjadi datar. Pembesaran payudara selama pubertas sebagai akibat

penimbunan jaringan lemak, jaringan ikat kolagen, dan peningkatan pertumbuhan saluran laktiferus. Proliferasi dan penimbunan jaringan tersebut karena peningkatan jumlah hormon estrogen di ovarium selama masa pubertas. Struktur khas kelenjar payudara wanita dewasa adalah lobulus berkembang pada ujung saluran kecil.

Sebuah lobulus terdiri dari berbagai saluran intralobular yang kosong dan menjadi satu di saluran interlobular terminal. Saluran laktiferus membentuk sinus laktiferus di dekat muara puting susu.

Pada jaringan ikat intralobular di sekeliling alveoli terdapat sel limfosit dan plasma. Populasi sel plasma meninggi sampai akhir kehamilan merupakan respon terhadap sekresi imunoglobulin yang memberikan imunitas pasif pada bayi baru lahir (Spatt JS and Tobin GR., 1988).

Puting susu berbentuk kerucut dapat berwarna merah muda, coklat muda, atau coklat tua. Pada sisi luar dilapisi epitel skuamosa berkeratin sampai perbatasan dengan kulit. Kulit di sekitar puting disebut areola. Warna areola menjadi gelap selama kehamilan oleh karena terjadi penimbunan lokal melanin. Sesudah melahirkan areola menjadi berwarna cerah tetapi jarang kembali ke bentuk semula (Spatt JS and Tobin GR., 1988).

### **2.1.2 Payudara pada masa kehamilan**

Pertumbuhan payudara pada masa kehamilan karena proliferasi alveoli pada ujung saluran interlobuler terminal dan kerja sinergik dari beberapa hormon, terutama estrogen dan progesteron.

Hormon ini merangsang pertumbuhan bagian sekresi (alveoli) kelenjar payudara. Selama laktasi, susu dihasilkan oleh sel epitel alveoli yang menumpuk di lumen dan saluran laktiferus (Junqueira LC dkk., 1992).

### **2.1.3 Insiden dan epidemiologi**

Karsinoma payudara merupakan keganasan yang banyak diderita wanita saat ini. Di Amerika pada tahun 1993, angka kejadian kanker adalah 28 per 100.000 populasi. Di Singapura pada tahun 1990, karsinoma payudara merupakan urutan teratas dari seluruh keganasan pada wanita dengan insidens 500 kasus baru dan diperkirakan menjadi 10.000 kasus baru pada tahun 2000 (Nambiar, 1991). Di India pada tahun 1990, karsinoma payudara menduduki urutan kedua dengan frekuensi 15,81% dari seluruh keganasan pada wanita atau 14,15 per 100.000 populasi (Chandrashekar, 1991). Di Indonesia pada tahun 1989, karsinoma payudara menduduki urutan kedua setelah kanker leher rahim (BRK dan Depkes, 1989).

Karsinoma payudara pada wanita jarang dijumpai sebelum umur 25 tahun kecuali pada kasus keluarga tertentu. Kanker ini dapat terjadi pada semua golongan umur dengan puncak insiden pada saat atau sesudah

**menopause.**

Berikut beberapa faktor yang dapat menyebabkan terjadinya karsinoma payudara:

**a. Keadaan geografi**

Di Amerika Serikat, wanita lima kali lebih mudah terkena karsinoma payudara dibandingkan dengan wanita Jepang dan Taiwan.

**b. Predisposisi genetik**

Karsinoma payudara mempunyai pengaruh sekitar 25% penderita dengan sindrom Li-Fraumeni, yang dihubungkan dengan mutasi pada gen supresor dari p53.

**c. Umur**

Kanker ini jarang terjadi pada wanita sebelum umur 25 tahun, tetapi akan cenderung meningkat kejadiannya sampai umur menopause.

**d. Masa reproduksi**

Resiko terkena kanker meningkat terutama pada wanita dengan menstruasi dini dan yang mengalami menopause lambat.

**e. Paritas**

Wanita yang tidak mempunyai anak (belum pernah melahirkan anak) sering terkena karsinoma payudara.

**f. Umur wanita saat melahirkan anak pertama**

Resiko meningkat bila saat melahirkan anak pertama berumur 30 tahun.

g. Kegemukan

Pada wanita yang mengalami kegemukan, depot lemaknya menyebabkan sintesis hormon estrogen.

h. Estrogen dari luar (eksogen)

Terapi hormon estrogen dalam dosis tinggi untuk mengatasi gejala menopause atau meningkatkan resiko terjadinya karsinoma payudara.

i. Kontrasepsi oral

Kontrasepsi oral umumnya menggunakan hormon estrogen dan progesteron yang seimbang, sehingga tidak jelas resiko terkenanya.

j. Perubahan fibrokistik dan hiperplasia epitel

Atipikal akan meningkatkan resiko berubah menjadi kanker (Robbin SL., 1994).

#### 2.1.4 Etiologi dan Patogenesis

Ada tiga pengaruh penting pada karsinoma payudara :

a. Faktor genetik

Faktor genetik berpengaruh dalam peningkatan terjadinya karsinoma payudara. Pada percobaan tikus dengan jalur sensitif kanker, melalui persilangan genetik didapatkan tikus yang terkena kanker.

Ada faktor keturunan pada suatu keluarga yang terkena karsinoma payudara, kemungkianan sangat besar. Kelainan ini diketahui terletak di lokus kecil di kromosom 17q21 pada karsinoma payudara yang

timbul saat usia muda.

#### b. Ketidakseimbangan hormonal

Kelebihan hormon estrogen endogen atau lebih tepatnya terjadi ketidakseimbangan hormon terlihat sangat jelas pada karsinoma payudara. Banyak faktor resiko yang dapat disebutkan seperti masa reproduksi yang lama, Nulipara, dan usia tua saat mempunyai anak pertama akan meningkatkan perjalanan estrogen pada siklus menstruasi.

Wanita pasca menopause dengan tumor ovarium fungsional dapat terkena kanker payudara karena adanya hormon estrogen yang berlebihan.

Suatu penelitian menyebutkan bahwa kelebihan jumlah estrogen di air seni, frekuensi ovulasi, dan umur saat menstruasi dihubungkan dengan meningkatnya resiko terkena karsinoma payudara.

Epitel payudara normal memiliki reseptor estrogen dan progesteron. Kedua reseptor ditemukan pada sebagian besar karsinoma payudara (Robbin SL., 1994).

#### c. Faktor lingkungan

Pengaruh lingkungan diduga karena berbagai faktor antara lain: alkohol, diet tinggi lemak, kecanduan minum kopi, dan infeksi virus. Hal tersebut mungkin mempengaruhi onkogen dan gen supresi tumor dari karsinoma payudara.

## 2.2 Tinjauan Karsinoma Payudara

Karsinoma payudara adalah proses keganasan pada payudara yang sering menyebabkan kematian pada kelompok wanita penderita karsinoma payudara. Di Indonesia angka kematian yang disebabkan oleh kanker ini cukup tinggi, yaitu pada tahun 1989, karsinoma payudara menduduki urutan kedua setelah kanker leher rahim (BRK dan Dep.Kes., 1989). Hal ini disebabkan karena terbatasnya tenaga medis, banyaknya penderita yang tidak tahu sehingga datang pada stadium lanjut. Pada hal apabila diketahui pada stadium dini akibat kanker ini masih bisa dicegah (Marwoto PD dkk., 1988).

Karsinoma payudara bukan sekedar proses tunggal yang terdapat pada berbagai jenis karsinoma dengan manifestasi klinis yang beraneka ragam. Penilaian yang diberikan tergantung dari struktur klinis penyakit yang dapat dilakukan dengan menilai besarnya tumor, kelenjar dan metastasisnya.

Keadaan klinis stadium karsinoma payudara berdasarkan *Americans White Communitte on Cancer* dibagi menjadi empat stadium yaitu :

1. stadium I, diameter tumor kurang dari 2 cm tanpa adanya nodul dan tidak ada metastasis,





2. stadium II, diameter tumor kurang dari 5 cm dengan aksila yang bergerak serta tidak ada metastasis jauh atau diameter lebih dari 5 cm tanpa adanya nodul dan metastasis,
3. stadium III, seluruh bentuk karsinoma payudara dengan segala ukuran, kemungkinan mengenai kulit pektoral dan dinding dada, dan nodul termasuk nodul aksilaris dan nodul limfe payudara, terfiksir tetapi tanpa metastase yang tersebar,
4. stadium IV, dengan segala bentuk karsinoma payudara dengan atau tanpa nodul, fiksasi pektoral, luka kulit atau fiksatif dinding dada, tetapi mempunyai metastasis yang tersebar (Robin SL., 1994).

## **2.2.1 Terjadinya karsinoma payudara**

### **a. Faktor resiko**

Faktor resiko tinggi untuk terkena karsinoma payudara menurut Asmino dan Hutomo Wijaya (1992) adalah penderita wanita di atas umur 30 tahun yang kemungkinan besar akan mendapat karsinoma payudara, kemudian resiko akan bertambah sampai umur 45 tahun dan setelah pasca menopause.

### **b. Riwayat karsinoma payudara**

Riwayat yang terkena karsinoma payudara pada anggota keluarga ibu, saudara perempuan, saudara perempuan ibu, wanita yang

tidak menikah, wanita yang tidak melahirkan, wanita yang melahirkan di atas 35 tahun.

**c. Faktor lain yang dapat menimbulkan karsinoma payudara**

Menurut Asmino dan Hutomo (1992) bahwa terdapat beberapa kelainan tumor jinak payudara, yaitu :

1. *Fibroadenoma*, biasanya terdapat pada wanita muda berumur kurang dari 25 tahun.
2. *Cystic disease*, paling sering terjadi pada wanita yang berumur 35-45 tahun disebabkan oleh gangguan hormonal.
3. *Mastitis*, yaitu proses peradangan jaringan yang dapat terjadi pada semua umur disebabkan adanya sumbatan saluran kelenjar payudara.
4. *Intraductal papiloma*, diawali dengan keluhan *nipple discharge* yang spontan.

### **2.3 Perjalanan Pengaruh Hormon Estrogen pada Kanker Payudara**

Pertumbuhan kelenjar payudara pada wanita dipengaruhi oleh adanya hormon estrogen dan hormon ini akan mempengaruhi proliferasi sel duktus kelenjar payudara. Dalam keadaan normal, epitel payudara mempunyai reseptor estrogen, sedang pada karsinoma payudara tidak seluruh kanker dapat diidentifikasi adanya reseptor (Robin SL.,1994).

## **2.4 Reseptor Estrogen pada Kanker Payudara**

Reseptor adalah protein seluler spesifik yang mengkomunikasikan stimulus endokrin dalam suatu sel. Molekul hormon steroid harus terikat lebih dahulu pada reseptornya sebelum respon seluler terhadap hormon tersebut dapat diamati. Protein seluler ini terdapat di jaringan membran sel sitoplasma dan nukleoplasma (Wittlif JL., 1987).

Kadar reseptor estrogen pada pasien yang sama dapat menurun sejalan dengan progresivitas penyakit. Hal ini menunjukkan adanya diferensiasi sel tumor yang lebih jauh selama proses metastasis atau dapat juga disebabkan pertumbuhan selektif sel-sel tumor dengan reseptor estrogen negatif. Karena itu pemeriksaan reseptor perlu diulang setiap kali ditemukan adanya rekurensi penyakit (Wittlif JL., 1984; Shandika, 1995).

### **2.4.1 Manfaat pemeriksaan reseptor estrogen**

Merupakan konsep yang menjadi dasar bagi terapi endokrin pada karsinoma payudara yaitu sel tumor tertentu akan tetap memiliki mekanisme seluler yang

dapat memberikan respon terhadap stimulus hormonal yang sama seperti sel normal asalnya. Adanya reseptor merupakan syarat mutlak untuk terjadinya respon tersebut (Horwits KB McGuire WL., Pearson OH, Segaloff A dalam Shandika, 1995). Jansen dkk. (1980) menyimpulkan

bahwa kemampuan suatu karsinoma payudara untuk mengikat estrogen dapat bersifat prediktif guna memperkirakan respon penderita terhadap terapi endokrin.

Menurut penelitian yang ditemukan pada *NIH Consensus Development Conference on Steroid Reseptor in Breast* (1980) sekitar 2/3 (67%) dari penderita karsinoma payudara dengan reseptor estrogen positif menunjukkan remisi yang nyata pada terapi hormonal. Sementara hanya 5% dari penderita dengan reseptor estrogen negatif akan menunjukkan hasil yang sama (Jansen EV, 1980).

## 2.5 Tinjauan tentang Teknik Imunohistokimia

Teknik imunohistokimia sebenarnya merupakan salah satu teknik imunohistokimia dalam bahan histopatologik dengan menggunakan antibodi (anti serum). Prinsip dari imunohistokimia adalah adanya afinitas spesifik antara antibodi dengan jaringan tertentu yang berperan sebagai antigen. Ikatan tersebut dapat diperlihatkan dengan memberikan label pada antibodi dengan zat *fluorescens* (metode *imunofluorecens* atau enzim (metode imunoenzim)). Enzim yang paling sering digunakan di dalam imunohistokimia adalah *HRP* (*Horse Radish Peroksidase*). Teknik ini dikenal sebagai imunoperoksidase (Bonish T Naish SJ., 1989).

### 2.5.1 Fiksatif dalam laboratorium

Fiksatif yang sering digunakan dalam laboratorium Patologi adalah aldehida yang berupa formalin dalam larutan 10% formalin. Larutan tersebut untuk blok jaringan yang berukuran standar menghasilkan morfologi yang optimal. Pada saat ini fiksatif formaldehida menjadi standar untuk pengawetan morfologi, namun hal ini mengurangi pengawetan pada antigen. Diakui bahwa antigen imunoreaktif makin lama makin hilang dalam proses fiksatif. Iradiasi (penyinaran) *microwave* (MW) telah diperkenalkan oleh Leong (1987) sebagai metode alternatif yang hasilnya cukup baik. Antigen tersebut dapat dipaparkan dengan pembukaan epitop dengan *microwave* (MW) pada metode imunohistokimia (Gown AM, de Wever N, Battifora H., 1993). Metode tersebut membuka jalan baru bagi standarisasi metode imunohistokimia dengan menggunakan retrieval epitop dan buffer sitrat pH 6,0 yang dibuat dalam penelitian di laboratorium dengan memberikan hasil yang lebih jelas (Shi RS, Key ME, Kaira KL (1991)). Mengingat makin banyaknya kebutuhan imunohistokimia sebagai alat bantu untuk pemeriksaan morfologi maka dibutuhkan pengawetan antigenitas jaringan tergantung pada berbagai faktor yang meliputi waktu fiksatif, bentuk dan konsistensi fiksatif, dan sifat epitop antigen pada jaringan antigen.

Penelitian ini juga menyebutkan bahwa antigen inti sel proliferasi tertutupi oleh fiksatif formalin, sehingga metode imunohistokimia dengan *microwave* (MW) pada buffer sitrat pH 6,0 untuk memperbaiki akurasi pemaparan reseptor estrogen tumor (Leong, 1993).

### 2.5.2 Fiksasi dalam imunohistokimia

Proses fiksasi merupakan proses yang mutlak diperlukan dalam patologi untuk menjaga keutuhan jaringan mencegah adanya perubahan-perubahan dan pembusukan pada jaringan yang diperiksa. Namun dalam imunohistokimia, fiksasi yang berlebihan sering menyebabkan denaturasi antigen pada jaringan atau antigen menjadi tidak dapat dijangkau oleh antibodi. Oleh karena itu proses fiksasi harus dilakukan secara optimal yang berarti harus dapat menjaga keutuhan morfologi jaringan dengan perubahan yang sedikit mungkin pada antigen jaringan. Larutan fiksasi yang dapat digunakan dalam imunohistokimia antara lain alkohol dan formalin.

#### a. Alkohol

Alkohol merupakan bahan fiksasi yang ideal dalam imunohistologi oleh karena alkohol memfiksasi jaringan tanpa membentuk senyawa aditif yang dapat menutup antigen jaringan. Penggunaan alkohol sebagai cairan fiksasi untuk imunohistokimia pertama kali dilakukan oleh *Saint-marie*. Walaupun alkohol baik untuk menjaga keutuhan antigen namun alkohol

tidak dapat digunakan untuk memfiksasi jaringan karena daya penetrasinya yang rendah sehingga menimbulkan kerusakan morfologi.

#### b. Formalin

Larutan formalin dalam bentuk *neutral-buffered formalin* merupakan bahan fiksasi yang paling banyak digunakan dalam teknik imunoperoksidase. Formalin juga merupakan larutan fiksasi yang digunakan secara rutin dalam histologi sehingga pada pemeriksaan imunoperoksidase tidak perlu melakukan pemrosesan jaringan. Formalin akan bereaksi dengan protein sel dan membentuk jembatan methylen dengan gugus hidroxy-methyl yang aktif. Waktu fiksasi yang berlebihan akan menyebabkan terbentuknya ikatan aldehid yang akan menutupi antigen jaringan sehingga tidak dapat dijangkau oleh antibodi.

#### c. Bahan fiksasi lain

Untuk pengecatan beberapa antigen tertentu seperti imunoglobulin intraseluler dan rantai j pada irisan parafin digunakan bahan fiksasi yang mengandung asam pikrat seperti larutan *Bouin* dan larutan *Zenker*. Dengan bahan fiksatif ini didapatkan morfologi yang lebih baik dan ketahanan antigen dapat lebih terjaga.

## 2.6 Pemrosesan Jaringan, *Embedding*, dan Deparafinisasi

### 2.6.1 Pemrosesan Jaringan

Pemrosesan jaringan meliputi tahap-tahap dehidrasi, deparafinisasi, penjernihan dan impregnasi. Dehidrasi merupakan proses yang menarik air dari jaringan

spesimen. Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan pada larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat sampai 100%. Setelah jaringan bebas dari air dilakukan proses penjernihan dengan mencelupkan jaringan dalam xilol selama 2x2 jam.

Proses penjernihan merupakan perantara dari air ke fase minyak (parafin) agar tidak terbentuk emulsi yang keruh. Setelah jaringan menjadi transparan dilakukan impregnasi yaitu mengisi pori-pori jaringan spesimen dengan parafin.

Tahap-tahap dalam pemrosesan jaringan ini tidak banyak pengaruhnya pada pengecatan imunohistokimia.

### 2.6.2 *Embedding*

Pemrosesan jaringan selanjutnya diikuti dengan *embedding* yaitu membungkus jaringan dengan bahan yang cukup keras (biasanya digunakan parafin dengan titik cair 56°-58°C) agar dapat dipotong dengan mikrotom setebal maksimum 6  $\mu$ m dan diletakkan pada gelas obyek.



### 2.6.3 Proses deparafinisasi

Deparafinisasi adalah proses untuk mengambil parafin dari jaringan. Jaringan yang mengandung parafin tidak dapat dicat dengan antibodi. Pada proses deparafinisasi jaringan dicelupkan ke dalam xilol untuk melarutkan parafin. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam alkohol dengan konsentrasi yang menurun.

## 2.7 Kontrol dalam Imunohistokimia

Kontrol pada imunohistokimia dapat berupa kontrol reagen dan kontrol jaringan. Kontrol mutlak diperlukan untuk menghindari hasil positif palsu atau negatif palsu.

### 2.7.1 Kontrol reagen

Kontrol reagen merupakan kontrol negatif. Kontrol ini dikerjakan untuk memastikan bahwa perubahan warna yang terjadi benar-benar merupakan akibat dari reaksi spesifik antara antigen-antibodi dan bukan karena reaksi non-spesifik. Untuk membuktikan spesifisitas reaksi antara antibodi primer dan antigen jaringan dapat dilakukan dengan cara mengganti antibodi primer dengan PBS, NHS (*Normal Horse Serum*), ataupun antibodi yang tidak relevan pada jaringan kontrol. Substitusi

antibodi primer dengan antibodi lain harus menghasilkan hasil yang negatif.

### **2.7.2 Kontrol Jaringan**

Kontrol jaringan disebut juga sebagai kontrol biologis. Dalam hal ini digunakan jaringan yang diketahui secara pasti memiliki antigen yang akan dideteksi (berfungsi sebagai kontrol positif). Kontrol jaringan ini dapat juga sekaligus berfungsi sebagai kontrol negatif dengan mengamati sel-sel pada jaringan yang diketahui tidak memiliki antigen yang akan dideteksi. Kontrol jaringan diperlukan untuk membuktikan bahwa reagen yang digunakan masih berfungsi dengan baik serta prosedur fiksasi dan pemrosesan jaringan tidak menghancurkan antigen yang akan dideteksi sehingga dapat menghindarkan hasil negatif palsu.

### **2.8 Metode Pengecatan dalam Imunohistokimia**

Teknik pengecatan dalam imunohistokimia berdasarkan atas beberapa antibodi, berfungsi antara lain :

1. sebagai cat khusus yang akan mengenali antigen dalam irisan jaringan,
2. sebagai antigen sehingga dapat diikat oleh antibodi dari binatang lain,
3. dapat diberi label berupa enzim sehingga kehadirannya dapat diamati.

### 2.8.1 Metode langsung

Metode pengecatan langsung dilakukan dengan cara menambahkan secara langsung antibodi yang sudah dilabel enzim pada irisan jaringan. Antibodi akan berikatan dengan komponen jaringan yang dituju secara spesifik dan dengan penambahan substrat-kromogen akan dapat memper-lihatkan tempat ikatan antibodi tersebut.

### 2.8.2 Metode tidak langsung

Pada metode pengecatan tidak langsung antibodi yang diberi label adalah antibodi sekunder. Antibodi primer akan mengikat antigen pada irisan jaringan, antibodi sekunder yang sudah dilabel akan mengikat antibodi primer yang selanjutnya dengan penambahan substrat kromogen akan memberikan perubahan warna. Antibodi sekunder dibuat dari binatang yang berbeda dengan antibodi primer.

### 2.8.3 Metode PAP

Metode *peroxidase-anti peroxidase* (PAP) dalam imunohistokimia pertama kali digunakan oleh *Sternberger* pada tahun 1974. Komponen jaringan yang dideteksi diikat dengan suatu antibodi primer yang spesifik. Ikatan ini kemudian diidentifikasi dengan kompleks PAP yang diikatkan dengan antibodi primer. Ikatan antara kompleks PAP dan antibodi primer ini dihubungkan dengan antibodi penghubung (*Bridging antibody*) yang



berasal dari binatang yang berbeda (misalnya antibodi primer dan kompleks PAP berasal dari *Rabbit* sedangkan antibodi penghubung adalah *Sheep anti rabbit*).

Struktur kompleks PAP telah ditemukan oleh *Sternberger* yang terdiri tiga molekul peroksidase dalam bentuk pertama yang stabil. Penggunaan kompleks PAP untuk identifikasi antibodi primer dapat menghindari kerugian yang disebabkan oleh prosedur konjugasi yang harus dikerjakan dalam metode antibodi-konjugat.

Proses pelabelan antibodi yang dilakukan pada metode konjugat dapat menutup bagian reaktif antibodi dan menurunkan daya ikat enzim. Metode PAP tidak memerlukan pelabelan antibodi sehingga tidak mengganggu fragmen Fc antibodi. Metode PAP juga memiliki sensitifitas 100 kali sampai 1000 kali lebih tinggi dari prosedur konjugat. Metode PAP merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam imunohistokimia terutama pada jaringan yang diproses secara rutin. Bila dibandingkan dengan metode yang lebih baru (Avidin-Biotin), metode PAP lebih murah dan cukup sederhana untuk memberikan hasil yang dapat dipercaya.

#### 2.8.4 Metode Avidin-Biotin Complex

Prosedur Avidin-Biotin didasarkan atas afinitas yang tinggi antara biotin yang merupakan salah satu vitamin dan biotin suatu glikoprotein. Biotin dapat diikat dengan antibodi dengan proses yang sederhana.

Pada metode ABC (*Avidin-Biotin Complex*) enzim peroksidase diikat pada biotin sedangkan pada metode LAB (*Labelled Avidin-Biotin*) enzim peroksidase diikat pada molekul avidin. Metode ini pertama kali diperkenalkan oleh Hsu pada tahun 1981.

#### 2.9 Penggunaan *Microwave* (MW) pada Imunohistokimia

*Microwave* (MW) telah digunakan untuk fiksasi jaringan, pemrosesan jaringan, untuk pewarnaan mengurangi masa inkubasi primer, dan untuk meningkatkan sensitivitas pewarnaan antigen limfosit pada potongan bahan jaringan (Leong A Sy, Millios J., 1985).

Penelitian lain mengungkapkan bahwa mekanisme daya kerja prosedur antigen (memulihkan antigen) *retrieval* pH 6,0 *microwave* belum diketahui, namun dapat memperbaiki metode pewarnaan jaringan yang berlapis parafin. Collaretti *et al.* melaporkan telah melakukan metode pewarnaan pada potongan jaringan berlapis parafin dengan menggunakan fiksasi formalin 10% dan prosedur antigen *retrieval microwawe* dan *buffer sitrat* pada pH 6,0 temperatur 100<sup>0</sup> C. Untuk mengukur peningkatan jumlah antigen jaringan, maka digunakan *microwawe* dan *buffer sitrat* pH 6,0 sebagai metode pewarnaan imunohistokimia untuk meningkatkan jumlah reseptor estrogen dan reseptor progesteron pada jaringan (Leong A Sy, Millios J., 1993).