

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Fiksasi dengan menggunakan sepuluh persen formalin memiliki banyak kegunaan, sehingga fiksasi tersebut yang paling banyak dipakai di laboratorium histopatologik diagnostik. Namun fiksasi formalin mengganggu atau merusak imunoreaktivitas banyak antigen dan epitop sel. Mengingat makin banyak kebutuhan pada imunohistokimia sebagai alat bantu utama pemeriksaan morfologi, saat ini diperlukan bukan hanya pengawetan sitomorfologi jaringan yang baik, melainkan juga pengawetan antigenesitas jaringan yang baik pula.

Pengawetan antigen jaringan tergantung pada berbagai faktor yang meliputi waktu fiksasi, bentuk dan konsentrasi fiksasi dan sifat epitop dari antigen. Walaupun pada beberapa keadaan, berbagai faktor yang mempengaruhi penggunaannya antigenesitas tidak diketahui. Metode fiksasi pilihan yang dipergunakan untuk menghasilkan pengawetan antigen dengan lebih baik. Hal ini meliputi penggunaan fiksasi seperti metacem (Gouwn, AM, Vegel, AM., 1985), aceton (Delson G, Chiffal S., 1989), fiksasi dasar atau yang mengandung sublimat (Poppema S Hoiema H., 1987).

Laporan *Cattoretti et al.* (1992) yang melakukan *imunostaining* pada potongan yang berlapis parafin dengan fiksasi formalin yang menggunakan prosedur retrieval antigen microwave yang menggunakan buffer sitrat sebagai

retrieval epitop microwave pada imunostaining untuk reseptor esatrogen progesteron. Deparafinisasi yang sempurna amat perlu agar epitop lebih terbuka sehingga tidak tertutup oleh parafin.

Dalam perlakuan yang menggunakan microwave pada potongan jaringan dalam buffer sitrat menghasilkan banyak perbaikan *imunostaining* dari sejumlah besar antigen jaringan. Hal ini yang mencolok adalah peningkatan jumlah Reseptor Estrogen dan tahap imunostaining pada antigen. Pada pemeriksaan antigen telah terbukti dapat mendeteksi karsinoma payudara yang dapat memberikan respons terhadap terapi hormonal. Pemeriksaan reseptor estrogen dapat memberikan respons terhadap terapi hormonal. Pemeriksaan reseptor estrogen merupakan pemeriksaan yang sangat penting dan menentukan dalam penanganan penderita karsinoma payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS). Pada pemeriksaan ini bukan hanya penting untuk memilih terapi yang sesuai untuk penderita karsinoma *re-current* atau metastase, tetapi juga berguna dalam hal memilih terapi adjuvants yang sesuai setelah penderita mendapatkan pengobatan inisial untuk penderita karsinoma payudara primer. Pemeriksaan reseptor estrogen ini dapat juga memberikan informasi yang berguna dalam menentukan prognosis. Pemeriksaan reseptor estrogen dengan cara imunohistokimia dapat digunakan sebagai alternatif, karena merupakan cara yang mudah dikerjakan, tidak memerlukan bahan radioaktif serta peralatan khusus baik dalam penyimpanan maupun dalam pemrosesan jaringan, dan dapat dikerjakan di seluruh tempat laboratorium

Patologi Anatomi yang memiliki fasilitas pemeriksaan imunohistokimia. Yang paling penting pada penyimpanan reagen, harus disimpan pada suhu 4°C agar reagen tidak mengalami kerusakan.

Oleh karena itu maka pemeriksaan dengan cara imunohistokimia reseptor estrogen dapat dikerjakan dengan menggunakan microwave buffer sitrat pH 6.0 temperatur 100<sup>0</sup> C. Dalam penelitian ini menggunakan metode ABC (*Avidin Biotin Complex*), yang menggunakan antibodi monoklonal. Karena pada antibodi tersebut secara spesifik mengikat pada estrogen sehingga lebih spesifik dibanding dengan antibodi poliklonal. Dalam membentuk runtutan silang protein juga menjadi salah satu kelemahan pada imunohistokimia, karena hal ini mengakibatkan tertutupnya antigen jaringan tertentu. Teknik pembukaan epitop dengan microwave telah disebut sebagai teknik baru untuk imunohistokimia rutin (Gouwn AM, Dewver N, Battipora H., 1993), yang telah direkomendasikan menjadi komponen integral imunostaining rutin (Leong AS Y, Millios J., 1993). Serta merupakan jalan baru untuk standarisasi dalam imunohistokimia (Swanson PE., 1993)

Catoretti *et al.* (1992) menunjukkan bahwa menggunakan microwave dengan buffer sitrat pH 6.0 temperatur 100<sup>0</sup> C merupakan larutan yang efektif untuk pemulihan bagian epitop yang kemudian prosedur tersebut dikembangkan untuk banyak jaringan (Leong AS Y, Millios J., 1993).

Pada beberapa antibodi, maka Dako TRS, yang memberi hasil terbaik terutama pada reseptor estrogen dan reseptor progesteron. Metode

pemeriksaan imunohistokimia reseptor estrogen dengan menggunakan antibodi spesifik akan meningkatkan jumlah reseptor estrogen dengan menyatukan digesti proteolitik dengan retrieval epitop menggunakan buffer sitrat pH 6.0 temperatur  $100^{\circ}$  C. Dalam studi tersebut terlihat pula bahwa teknik ini memperbaiki *imunostaining* pada semua antigen cara yang tidak seragam.

Pada beberapa keadaan, paparan pada prosedur ini tidak memperbaiki imunostaining, seperti halnya dengan antibodi. Namun sebaliknya, perlakuan dengan menggunakan microwave dalam larutan buffer sitrat pH 6.0 temperatur  $100^{\circ}$  C penting untuk penampakan reseptor estrogen (Leong AS Y, Millios J., 1993).

Hal ini menunjukkan bahwa istilah retrieval epitop antigen perlu diganti dengan retrieval epitop, karena hanya epitop antigen reseptor estrogen yang dipulihkan, seperti pada imunoreaktivitas. Prosedur retrieval epitop masih harus dikembangkan lebih lanjut, karena beberapa konsep dalam teknik retrieval epitop. Karena dalam hubungan silang protein yang dihasilkan dengan fiksasi formalin dapat dipulihkan dengan suhu yang tinggi, maka akan menunjukkan perubahan denaturasi pada suhu antara  $70^{\circ}\text{C}$  -  $90^{\circ}\text{C}$ , yang pada protein murni mengalami perubahan. Sedangkan protein yang difiksasi dengan formalin dapat menahan denaturasi juga pada suhu yang sama. Pada jaringan yang fiksasi formalin memerlukan waktu pemanasan yang lebih lama.

Untuk mendapatkan imunostaining yang optimal, beberapa studi telah menunjukkan bahwa efek fiksasi formalin dapat dilakukan dengan pencucian

jaringan yang lebih lama dalam air atau pada buffer (Larsson L., 1993). Seperti halnya yang dilakukan Catoletti *et al.* (1982) bahwa penggunaan microwave dengan buffer sitrat pada pH 6,0 untuk retrieval antigen pada potongan jaringan berlapis parafin yang telah difiksasi dengan formalin menunjukkan hasil yang optimal atau hasil yang baik.

Pada penelitian ini mempunyai keterbatasan, terutama dalam menentukan jumlah reseptor estrogen positif karena penghitungan terasa kasar. Keadaan tersebut dapat dikurangi dengan menghitung ulang 3 kali diambil hasil rata-ratanya. Pada saat ini penentuan jumlah reseptor estrogen digunakan sebagai dasar pemberian terapi anti hormonal. Dari hasil penelitian ini ada perbedaan pada peningkatan jumlah reseptor estrogen pada metode imunohistokimia menggunakan microwave dibandingkan dengan imunohistokimia tanpa menggunakan microwave pemeriksaan reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS). Pada pemeriksaan reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS) dengan jumlah reseptor estrogen yang lebih banyak akan semakin progresif bila tidak diberikan terapi anti hormonal, begitu pula sebaliknya pemeriksaan reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS) yang jumlah reseptor estrogennya sedikit (< 10%), maka tidak perlu diberikan terapi anti hormonal karena respon berkurang dan perlu kemoterapi.

Dengan demikian perlu ada penelitian lanjutan yang dapat saling menunjang banyak faktor, sehingga akan memperbaiki penelitian selanjutnya.

Dengan metode pemeriksaan imunohistokimia yang menggunakan microwave, terdapat perubahan yang diketahui dalam reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS). Dari hasil pengamatan pada penelitian ini terlihat adanya perbedaan secara bermakna antara reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS) pada metode pemeriksaan imunohistokimia menggunakan microwave lebih meningkat jumlah reseptor estrogen dibanding metode pemeriksaan imunohistokimia tanpa menggunakan microwave. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Leong AS. Y, Millios. J., 1993) yang mengemukakan bahwa metode pemeriksaan imunohistokimia menggunakan microwave dengan bufer sitrat pH 6.0 dapat meningkatkan jumlah reseptor estrogen kanker payudara jenis "*infiltrating ductal*" (NOS).

pada hasil penelitian saya menunjukkan bahwa penggunaan microwave dengan buffer sitrat 6.0 pH 6.0 temperatur 100<sup>0</sup> C pada pemeriksaan imunohistokimia ternyata menunjukkan hasil reseptor estrogen yang lebih banyak dan pemeriksaan yang lebih cepat daripada tanpa menggunakan microwave, yaitu :

1. Ada perbedaan yang bermakna tentang jumlah reseptor estrogen dalam jaringan tumor pada pemeriksaan menggunakan microwave dibandingkan tanpa microwave ( $p < 0,05$ ).

2. Ada perbedaan yang bermakna tentang lama pemeriksaan, dengan t test berpasangan antara yang menggunakan microwave dan tanpa menggunakan microwave dengan perbedaan waktu 2 jam 10 menit.

Hal ini disebabkan oleh karena terbukanya epitop reseptor estrogen yang disebabkan oleh pengaruh microwave sehingga tidak menghalangi reaksi antigen antibodi. Tertutupnya epitop ini disebabkan karena denaturasi protein antigen oleh fiksasi formalin dan deparafinisasi yang kurang sempurna, dengan menggunakan microwave dengan buffer sitrat pH 6.0 temperatur  $100^{\circ}$  C, reaksi antigen antibodi tidak terhalangi.