

Pengecatan Imunohistokimia HER2 Menggunakan Susu Skim dan Normal Serum

Immunohistochemistry Staining of HER2 Using Nonfat Dry Milk and Normal Serum

Arya Iswara*, Sri Sinto Dewi, Yulfa Ariza Masruro

Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang

*Corresponding author: aryaiswara@unimus.ac.id

ABSTRAK

HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) merupakan suatu reseptor pada permukaan sel yang berpengaruh pada proliferasi jaringan, mutasinya dapat menjadi onkogen. Over ekspresi dari HER2 pada kasus kanker dapat dilihat dengan teknik imunohistokimia (IHC). Protein blocking merupakan salah satu langkah dalam pengecatan IHC yang berfungsi menghalangi ikatan non spesifik pada jaringan dengan menggunakan normal serum dan protein solution (susu skim). Tujuan penelitian mengetahui gambaran hasil pengecatan IHC menggunakan normal serum dan susu skim. Penelitian secara eksperimental dengan pendekatan cross sectional. Sampel penelitian jaringan kanker payudara HER2 positif dengan stadium +2 dari satu organ dan pasien yang sama. Pengecatan IHC menggunakan teknik Strep (Avidin) Biotin Complex. Pengecatan menggunakan normal serum didapatkan hasil +2, menggunakan susu skim 1% didapatkan hasil +3, sedangkan menggunakan susu skim 2% dan 3% didapatkan hasil +2. Terdapat perbedaan yang signifikan antara normal serum dengan susu skim 1%. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara normal serum dengan susu skim 2% dan susu skim 3%. Simpulan adalah normal serum dapat diganti dengan susu skim 2%.

Kata kunci: HER2, normal serum, susu skim

ABSTRACT

HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) is a receptor on the cell surface that affect on the tissue proliferation, HER2's mutations can become the oncogenes. Over expression of HER2 in cancer cases can be seen in immunohistochemistry (IHC) technique. Protein blocking is the one of IHC-staining's step that blocks the non-specific binding on tissue using normal serum and protein solution (nonfat dry milk). Purpose of the research was to described the results of IHC staining using normal serum and nonfat dry milk. This research was experimental with cross-sectional approach. Sample of the research was HER2 positive on breast cancer tissue with stadium +2 of a same organ and patient. IHC-staining used Strep(Avidin) Biotin Complex technique. IHC-staining used normal serum obtained the result +2, used 1% nonfat dry milk obtained +3, while the 2% nonfat dry milk and 3% nonfat dry milk obtained the results of +2. There was significant difference between normal serum with 1% nonfat dry milk. There wasn't significant difference between normal serum with 2% nonfat dry milk and 3% nonfat dry milk. The conclusion is normal serum can be replaced with 2% nonfat dry milk.

Keywords: HER2, normal serum, nonfat dry milk

PENDAHULUAN

Kanker merupakan sel dengan proliferasi yang tidak terkendali dan dapat bermetastasis menuju jaringan tubuh lain melalui cairan limfe dan darah (Stratton *et al.*, 2009). Mutasi DNA dapat berasal dari faktor lingkungan seperti radiasi, paparan bahan kimia dan virus (Kumar *et al.*, 2010). Kanker ditemukan karena adanya mutasi dan ekspresi hasil metabolisme patologik yang berlebihan (over ekspresi). Over ekspresi dari

reseptor faktor pertumbuhan yang dapat ditemukan pada kasus kanker adalah HER2 (Kumar *et al.*, 2005). HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) merupakan suatu reseptor pada permukaan sel yang berpengaruh pada proses proliferasi sel pada jaringan (Coussen, 2005).

Ekspresi HER2 pada kasus kanker dapat dilihat dengan suatu penanda biologi atau biomarker. *American Society of Clinical Oncology/Collage of American Pathologis* (ASCO/CAP) telah me-

netapkan bahwa teknik yang dapat digunakan untuk pemeriksaan biomarker secara valid adalah *immunohistochemistry* (IHC) dan *fluorescence in situ hybridization* (FISH) (Park *et al.*, 2014). IHC merupakan suatu teknik yang digunakan untuk menetapkan dan mengidentifikasi jenis protein tersebut dalam sel-sel jaringan dengan memanfaatkan prinsip pengikatan antigen-antibodi (Hastuti dan Lubis, 2011).

Kesalahan-kesalahan yang terjadi selama proses pengecatan IHC dapat menimbulkan *trouble shooting* yang dapat memengaruhi hasil pemeriksaan, salah satunya adalah buruknya intensitas *background staining* yang dapat disebabkan oleh tidak cukupnya *blocking agent* yang digunakan. *Blocking agent* yang dapat diantaranya adalah *normal serum*, *protein solution*, dan *commercial mixes*. *Normal serum* hingga saat ini masih sering digunakan untuk *protein blocking* karena *normal serum* tidak dapat terlibat dalam reaksi imunologi (Dabbs, 2014), tetapi dalam penggunaannya sehari-hari *normal serum* memiliki kekurangan, yaitu harganya relatif mahal dan susah didapat sehingga diperlukan *blocking agent* yang lebih mudah didapat dan harganya relatif lebih murah yaitu *protein solution*, seperti *nonfat dry milk* (susu skim).

METODE

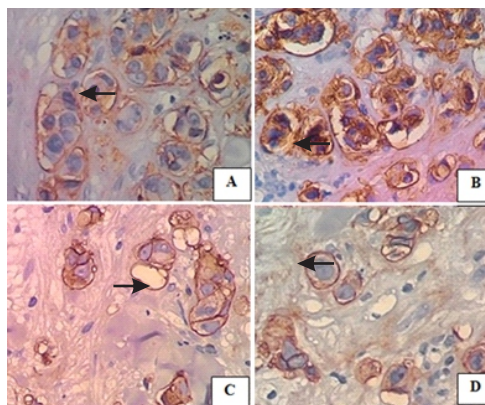
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan susu skim Indomilk® 1%, 2%, dan 3% pada pengecatan IHC HER2 metode (*Strep*) *Avidin biotin complex* dalam proses *protein blocking*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Blok parafin dari jaringan kanker payudara HER2 positif dipotong menggunakan mikrotom menjadi 12 sediaan untuk 4 perlakuan berbeda, masing-masing 3 sediaan untuk setiap perlakuan. Penelitian tentang pengecatan IHC menggunakan *normal serum* atau *background sniper* dan susu skim dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% dilakukan terhadap 3 sediaan untuk masing-masing perlakuan, yang berasal dari organ payudara dari satu pasien kanker dengan HER2 positif. Hasil pengamatan dari pengecatan IHC dengan *normal serum* dan susu skim 1%, 2%, dan 3% dapat dilihat pada Gambar 1.

Ekspresi HER2 tampak pada bagian membran sel, yang akan dinilai berdasarkan intensitasnya, yaitu kuat-lemahnya penyerapan cat. Distribusi ekspresi HER2 berdasarkan intensitasnya terhadap tiga sediaan dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil yang telah ditunjukkan mem-



Gambar 1. Pengecatan IHC menggunakan *normal serum* (A), susu skim 1% (B), susu skim 2% (C), susu skim 3% (D) pada perbesaran 400x.

Keterangan tanda panah: ekspresi HER2 pada membran sel

Tabel 1. Hasil pengamatan pengecatan IHC berdasarkan ekspresi HER2

Blocking Agent	Penilaian ekspresi HER2		
	1	2	3
Normal serum	2+	2+	2+
Susu skim 1%	3+	3+	3+
Susu skim 2%	2+	2+	2+
Susu skim 3%	2+	2+	2+

perlihatkan bahwa *normal serum* dapat diganti dengan susu skim dengan konsentrasi 2% dan 3% karena mampu menghalangi ikatan nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Susu skim mengandung dua jenis protein, yaitu protein kasein (76 – 80%) dan non kasein (14 – 24%), protein yang berperan pada pengikatan nonspesifik adalah protein jenis kasein (Kumar *et al.*, 2009 ; Thompson *et al.*, 1965). pengecatan IHC yang menggunakan susu skim konsentrasi 1% menunjukkan adanya peningkatan intensitas HER2 dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan *normal serum*. Intensitas yang tinggi ini disebabkan oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan. Antibodi primer bersifat spesifik sehingga hanya akan berikatan dengan antigen spesifik pula, namun antibodi sekunder bersifat universal yang dapat membentuk ikatan spesifik dengan antibodi primer maupun nonspesifik dengan protein nonspesifik pada jaringan. Rendahnya konsentrasi protein yang terdapat dalam susu skim konsentrasi 1% akan menurunkan kemampuannya berikatan dengan protein nonspesifik sehingga kemungkinan antibodi sekunder untuk berikatan dengan antigen nonspesifik menjadi tinggi (Irawan, 2013).

Intensitas *background staining* tidak dipengaruhi oleh jenis *blocking agent* yang digunakan, namun besaran konsentrasi protein dalam *blocking agent* yang digunakan untuk menghalangi ikatan non spesifik yang terbentuk. Susu skim dengan konsentrasi sebesar 1% memiliki konsentrasi protein yang lebih rendah daripada 2% dan 3% sehingga hal ini dapat memungkinkan untuk protein nonspesifik lain yang tidak dihalangi oleh protein susu skim 1% untuk berikatan dengan antibodi sekunder. Beberapa *blocking agent* yang berfungsi untuk menghalangi ikatan nonspesifik perlu dikembangkan (Duhamel dan Johnson, 1985 ; Vogt *et al.*, 1987).

KESIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah gambaran

pengecatan IHC HER2 menggunakan *normal serum* didapatkan hasil +2, susu skim Indomilk® 1% didapatkan hasil +3, susu skim Indomilk® 2% didapatkan hasil +2, dan susu skim Indomilk® 3% didapatkan hasil +2. Pembacaan intensitas HER2 pada pengecatan IHC menggunakan susu skim Indomilk® 1% memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *normal serum*, susu skim Indomilk® 2%, dan susu skim Indomilk® 3%. Hasil pembacaan intensitas pengecatan IHC HER2 antara *normal serum* dengan susu skim 2% dan 3% tidak menunjukkan adanya perbedaan. *Normal serum* dapat diganti dengan susu skim Indomilk® 2%

SARAN

Protein blocking pada pengecatan IHC HER2 dapat menggunakan *blocking agent* berupa susu skim Indomilk® 2%. Penelitian lanjutan dapat dilakukan dengan menggunakan *blocking agent* berupa larutan protein yang lain sehingga lebih bervariasi. Selain itu penelitian juga dapat dikembangkan dengan melakukan modifikasi lain pada prosedur pengecatan IHC seperti penggantian metode fiksasi dan *antigen retrieval* yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Causse L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. 2005. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science Journal* 230 (4730): 1132-9.
- Dabbs DJ. 2013. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications: Techniques of Immunohistochemistry: Principles, Pitfalls, and Standardization 4th Edition*. United States of America: Elsevier Saunders p.1-19.
- Duhamel RC dan Johnson DA. 1985. Use of nonfat dry milk to block nonspecific nuclear and membrane staining by avidin conjugates. *J Histochem Cytochem* 33: 711-4.
- Hastuti NW dan Lubis HML. 2011. Manfaat pemeriksaan imunohisto(sito)kimia. *CDK* 38 (5).
- Irawan, Vidya. IHC part 3: Normal Serum dan Imunofluoresence. <http://vetsciencereview.blogspot.co.id/2015/11/ihc-part-3-normal-serum-dan.html>. 13 November 2013 (diakses pada 16 Juli 2016)
- Kumar GL, Wendelboe HG, Bisgaard K, Boenisch T, Farmilo AD, Stead RH, et al. 2009. *Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition*. California: DAKO Corporation. p.120.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. 2010. *Robbins and Cotran Pathologic Basic of Disease 8th Edition*. Philadelphia: Saunders Elsevier.

- Kumar V, Cotran RS, dan Collins T. 2005. *Neoplasia in Robbins Pathologic Basic of Disease 7th Edition*. Philadelphia: WB Saunders. p.269-71.
- Park MHM, Ebel JJ, Zhao W, Zynger DC. 2014. ER and PR immunohistochemistry and HER2 FISH versus oncotype DX: implication for breast cancer treatment. *The Breast Journal* 20 (1): 37-45.
- Prichard JW. 2014. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 138.
- Stratton MR, Campbell PJ, dan Futreal PA. 2009. The cancer genome. *Nature* 458.
- Thompson MP, Tarrasuk NP, James R, Lillevik HA, Aswirth UI, Pose D. 1965 Nomenclature of proteins of cow milk and revision. *J. Dairy Sci*: 157.
- Vogt RF Jr, Philips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. 1987. Quantitative difference among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *J Immunol Methods* 101: 45