



Susu kedelai sebagai *Protein Blocking* pada Pengecatan *Esterogen Receptor* Metode Immunohistokimia

Soy Milk as a Protein Blocking in the Devotion of Esterogen Receptor Using Immunohistocymia Method

Retno Nur fauziah¹, Tulus Aryadi², Arya Iswara³

¹Program Studi D IV Analis Kesehatan Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan

^{2,3}Departemen Sitohistoteknologi Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan

Universitas Muhammadiyah Semarang

¹retnonurfauziah76@gmail.com

Abstrak

Susu kedelai merupakan sumber protein nabati dengan kandungan protein yang tinggi, sehingga susu kedelai dapat dijadikan blocking agent yang berfungsi mengikat protein non spesifik yang terdapat pada jaringan. Penegakkan diagnosis kanker payudara salah satunya dengan pengecatan IHC ER (*Esterogen Receptor*). ER merupakan protein yang dihasilkan oleh jaringan yang mengalami mutasi gen pada DNA yang mengakibatkan terjadinya proliterasi sel. Tujuan penelitian untuk mengetahui gambaran hasil pengecatan IHC ER menggunakan susu kedelai konsentrasi 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5% dengan normal serum sebagai kontrol. Sampel penelitian adalah jaringan kanker payudara ER +3. Pengecatan IHC ER menggunakan teknik indirec dengan metode *Strep (Avidin) Biotin Complex*. dengan susu kedelai konsentrasi 2,0%, 2,5%, 3,0% dan 3,5% dengan *normal serum* sebagai kontrol. Hasil pengecatan ER menggunakan susu kedelai 2% dan 2,5% didapatkan hasil intensitas positif 2 (+2), susu kedelai 3,0% dan 3,5% didapatkan hasil positif 3 (+3). Pengecatan IHC ER dengan normal serum sebagai kontrol didapatkan +3. Konsentrasi paling baik pada pengecatan IHC menggunakan susu kedelai adalah pada konsentrasi 3% dan 3,5% dengan hasil +3. Tidak terdapat perbedaan antara normal serum dengan susu kedelai.

Kata kunci: IHC, ER, susu kedelai

PENDAHULUAN

Imunohistokimia adalah suatu metode untuk mendeteksi keberadaan molekul atau berbagai macam komponen yang terdapat di dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antara antigen dengan antibodi. Metode imunohistokimia berdasarkan pada penggunaan suatu antibodi yang spesifik yang dilabel dengan ikatan kimia pada suatu zat yang dapat dilihat, tanpa label itu mempengaruhi kemampuan antibodi untuk membentuk suatu kompleks dengan antigen yang bersangkutan (Unitly dan Sahertian, 2010).

Uji reseptor estrogen (ER) dan progesteron reseptor (PR) dilakukan pada evaluasi kanker payudara. Sementara kegunaan klinis ER sebagai biomarker prediktif untuk mengidentifikasi pasien yang mungkin mendapat manfaat. Terapi hormonal sudah mapan, nilai tambah PR kurang terdefinisi dengan baik. Tujuannya adalah untuk menilai distribusi, reproduktifitas inter-assay, dan signifikansi prognostik subtype kanker payudara didefinisikan oleh pola ekspresi ER dan PR (Hefti et al, 2013).

Imunohistocymia atau IHC adalah proses untuk menetapkan lokasi dan jenis protein (antigen) tersebut di dalam sel-sel jaringan (Hastuti dan Lubis, 2011). Imunohistokimia seringkali digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein yang tereksresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Ramos-vara, 2005).

Protein blocking yang masih digunakan hingga saat ini adalah normal serum, karena normal serum tidak terlibat dalam reaksi imunologi (Dabbs, 2013). Protein blocking bertujuan untuk meminimalisir protein non-spesifik yang berkompetisi dalam mengikat antibodi yang ada dalam jaringan. Penambahan protein akan menjenuhkan dan menetralkan lokasi yang bermuatan hanya dengan antigen spesifik, sehingga pewarnaan nonspesifik yang dihasilkan oleh protein non-immunologis tidak akan menimbulkan warna positif (Masruro, 2016). Dalam sehari-hari, penggunaan *normal serum* relatif lebih mahal, serta sulit didapat karena tidak dijual secara bebas, oleh karena itu diperlukan *blocking agent* yang relatif lebih murah dan mudah didapat yaitu *protein solution*, salah satunya susu kedelai.

Susu kedelai adalah emulsi putih yang menyerupai susu sapi (susu konvensional) baik dalam penampilan maupun konsistensi. Susu kedelai adalah sumber protein dan kalori yang murah untuk dikonsumsi manusia yang sangat baik dibandingkan dengan susu lainnya dan dapat digunakan sebagai pengganti susu sapi dan harganya lebih murah (Ikya et al, 2013). Susu kedelai mengandung protein 3,50% (sama dengan susu sapi), 2,00% lemak dan 2,90% karbohidrat (Reyes et al, 2015). Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil pengecatan imunohistokimia Estrogen Receptor menggunakan *susu kedelai* sebagai *protein*. Tujuan khususnya adalah memeriksa hasil pengecatan IHC ER dengan susu kedelai konsentrasi 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% dan mengetahui konsentrasi dan intensitas blocking protein dengan susu kedelai yang paling baik dalam pengecatan IHC ER.

Bahan dan Metode

Metode penelitian ini adalah eksperimental dengan pendekatan *cross sectional*. Bahan menggunakan jaringan kanker payudara ER +3, pengecatan IHC pada proses blocking protein menggunakan *normal serum* sebagai kontrol dan susu kedelai dengan konsentrasi 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% sebagai perlakuan.

Analisis Data

Hasil yang diperoleh dianalisa menggunakan analisis *Kruskal-Wallis* untuk menguji ada-tidaknya perbedaan.

Prosedur Penelitian

Prosedur pengecatan IHC mengacu pada kit *leica microsystem*, deparafinase : rendam dalam xylol I, xylol II, xylol III masing-masing 5 menit, rehidrasi : rendam etanol 100%, 90%, 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 5 menit, dimasukkan kedalam antigen retrieval (panaskan microwave dahulu 100°C selama 4menit) masukan slide ke dalam microwave 90°C selama 30 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruang selama 40 menit dan bilas dengan air mengalir selama 2 menit.

Rendam dengan H₂O₂ 3% dalam methanol selama 5 menit, rendam dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit. *Protein blocking* : Genangi dengan NSS (Normal Swine Serum) dan larutan *blocking agent* susu kedelai dengan konsentrasi 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% selama 5 menit, bilas dengan PBS pH 7,4 selama 2x masing-masing selama 5 menit, tetesi preparat dengan antibodi primer ER diamkan selama 1 jam dikulkas. Bilas dengan PBS pH 7,4 selama 2x masing-masing selama 5 menit, tetesi dengan preparat dengan antibodi sekunder post primary diamkan selama 30 menit, bilas dengan PBS pH 7,4 sebanyak 2x masing-masing 5 menit, kemudian tetesi preparat dengan reagen compact polymer selama 30 menit, preparat ditetesi DAB cromogen substrat (tanpa terkena cahaya) selama 5 menit dalam suhu ruang, dicuci dengan aquades sebanyak 2x masing-masing selama 5 menit, kemudian dikeringkan.

Lakukan pengecatan pembanding : Genangi preparat dengan Hematoxylin selama 5 menit, cuci dengan aquades sebanyak 2x masing-masing selama 5 menit, dehidrasi : etanol 70%, 90%, 100% masing-masing selama 5 menit, clearing : xylol I, xylol II, dan xylol III masing-

masing selama 5 menit. Tetesi dengan entelan, tutup dengan cover slide. Amati dengan mikroskop perbesaran 400x.

Penilaian Intensitas ER

Penilaian intensitas ER dengan menggunakan kriteria pada tabel 1.

Tabel 1:
Kriteria Penilaian Intensitas HER2

Skor	Penilaian
0	Intensitas, tidak terlihat kurang dari 10%
1+	Intensitas, inti terwarnai terlihat samar atau lemah
2+	Intensitas, inti terwarnai tidak menyeluruh atau sedang
3+	Intensitas, inti terwarnai secara menyeluruh atau bersifat kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil pengamatan dari pengecatan IHC dengan menggunakan susu kedelai 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% dan *normal serum* sebagai kontrol dapat dilihat sebagai berikut :

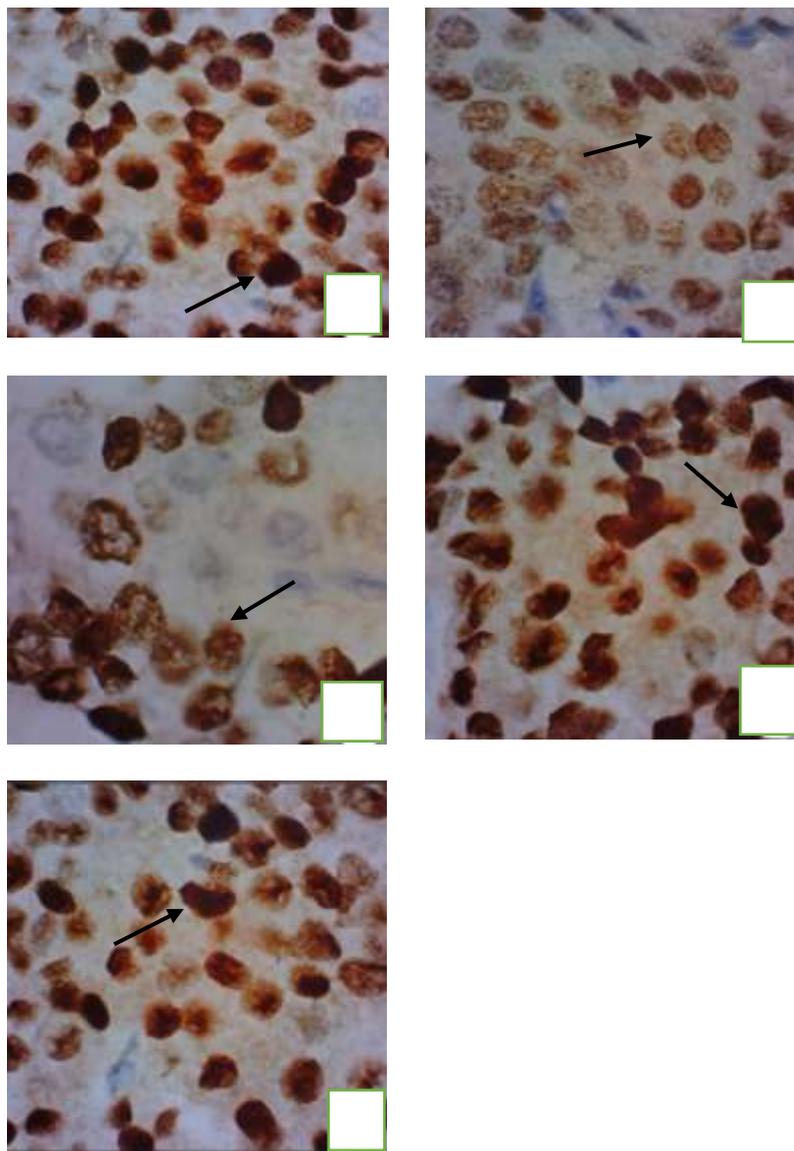
Tabel 4. Hasil pengamatan pengecatan IHC berdasarkan ekspresi ER

Blocking Agent	Penilaian Ekspresi ER						Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	
Normal Serum	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Susu kedelai 2%	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
Susu kedelai 2,5%	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2
Susu kedelai 3%	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Susu kedelai 3,5%	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

Hasil pengamatan dari pengecatan IHC dengan *normal serum* dan susu kedelai konsentrasi 2%, 2,5%, 3% dan 3,5% dapat dilihat pada gambar 1.

Gambar 1:

Pengecatan IHC menggunakan susu kedelai dengan perbesaran 400x. A. score (+3) sebagai kontrol (*normal serum*). B dengan konsentrasi 2% dan C dengan konsentrasi 2,5% menghasilkan score (2+) warna coklat pada inti kurang jelas. D dengan konsentrasi 3% dan E dengan konsentrasi 3,5% menghasilkan score (3+) warna coklat pada inti jelas.



Pembahasan

Penyebab utama terjadinya *background staining* pada IHC adalah interaksi *hydrophobic* dan *ionic* serta aktifitas *endogenous enzyme*, ikatan *hydrophobic* dapat diminimalisir dengan proses protein blocking (Kabiraj et al. 2015). Protein blocking dapat dilakukan menggunakan normal serum, atau larutan blocking seperti bovine serum albumin (BSA), gelatin, *tryptone casein peptone*, *non-fat dry milk* dan casein (Buchwalow et al. 2011).



Protein blocking bertujuan untuk meminimalisir protein non-spesifik yang berkompetisi dalam mengikat antibodi yang terdapat dalam jaringan. Penambahan protein akan menjenuhkan dan menetralkan lokasi yang hanya bermuatan dengan antigen spesifik, sehingga pewarnaan non-spesifik yang dihasilkan oleh protein non-immunologis tidak akan menimbulkan warna positif (Masruro, 2016). Protein yang dapat ditambahkan adalah *normal serum*. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *normal serum* juga dapat digantikan dengan susu kedelai 3,0% karena antara *normal serum* dan susu kedelai memiliki kesamaan fungsi dan cara kerja, yaitu menghalangi ikatan non-spesifik yang terdapat dalam jaringan. Susu kedelai mengandung kadar protein yang sangat tinggi, dimana susu kedelai mengandung protein 3,50% (sama dengan susu sapi), 2,00% lemak dan 2,90% karbohidrat (Reyes et al, 2015). *Tryptone casein peptone* juga merupakan *blocking agent* yang efektif untuk menghalangi ikatan non-spesifik (Kim et al, 2003).

Susu kedelai 3% dan 3,5% mengalami peningkatan intensitas *esterogen receptor* dan mendapatkan hasil yang sama apabila dibandingkan dengan kontrol yaitu *normal serum*. Intensitas yang tinggi disebabkan antibodi sekunder yang berikatan dengan protein non-spesifik yang terdapat dalam jaringan. Antibodi primer bersifat spesifik sehingga hanya berikatan dengan antigen spesifik pula, namun antibodi sekunder bersifat universal sehingga dapat membentuk ikatan spesifik dengan antibodi primer maupun non-spesifik dengan protein non-spesifik lain pada jaringan. Intensitas yang tinggi disebabkan antibodi sekunder berikatan dengan protein non-spesifik yang terdapat dalam jaringan. Rendahnya konsentrasi protein yang terdapat dalam susu kedelai 2% dan 2,5% akan menurunkan kemampuannya dalam berikatan dengan protein non-spesifik sehingga kemungkinan antibodi sekunder untuk berikatan dengan antigen non-spesifik menjadi tinggi (Irawan, 2013).

Tingginya intensitas background staining tidak disebabkan oleh jenis blocking agent yang digunakan, melainkan konsentrasi protein dalam blocking agent yang digunakan untuk menghalangi ikatan non-spesifik yang terbentuk. Susu kedelai 3% dan 3,5% memiliki konsentrasi protein yang lebih tinggi daripada 2% dan 2,5% sehingga memungkinkan untuk protein *non-spesifik* lain tidak terhalangi oleh protein susu kedelai 3% dan 3,5% yang berikatan dengan antibodi sekunder. Beberapa blocking agent yang berfungsi untuk menghalangi ikatan nonspesifik perlu dikembangkan (Duhamel and Johnson, 1985 ; Vogt et al., 1987).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa gambaran pengecatan IHC ER menggunakan *normal serum* didapatkan hasil intensitas kuat (+3) , susu kedelai konsentrasi 2% didapatkan hasil intensitas sedang(+2),susu kedelai konsentrasi 2,5% didapatkan hasil intensitas sedang (+2), susu kedelai konsentrasi 3% didapatkan hasil intensitas kuat (+3), susu kedelai konsentrasi 3,5% didapatkan hasil intensitas kuat (+3). Pembacaan intensitas ER pada pengecatan IHC menggunakan susu kedelai konsentrasi 2% dan 2,5% memiliki perbedaan jika dibandingkan dengan *normal serum*, susu kedelai 3% dan 3,5%.

Hasil pembacaan intensitas pengecatan IHC antara *normal serum* dengan susu kedelai 3% dan 3,5% tidak berbeda, konsentrasi 3% lebih rendah dan sudah mampu digunakan sebagai blocking agent. Susu Kedelai 3% paling baik digunakan untuk pengganti *normal serum* pada proses protein blocking pengecatan imunohistokimia ER.

DAFTAR PUSTAKA

Buchwalow, I. et al., 2011. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. *Scientific Reports*, 1, pp.1–6.



- 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
- Hefti, M.M., Hu, R., Knoblauch, N.W., Collins, L.C., Haibe-Kains, B., Tamimi, R.M. and Beck, A.H., 2013. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research*, 15(4), p.R68.
- Hastuti NW, Lubis HML. 2011. Manfaat Praktis Pemeriksaan Imunohisto(sito)kimia. *Cermin Dunia Kedokteran* edisi 38(5): 384-386
- Ikya, J. K., Gernah, D.I., Ojobo, H.E. and Oni, O.K., 2013. Effect of cooking temperature on some quality characteristics of soy milk. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(5), pp.543-546.
- 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 18 januari 2018)
- Kim SH, Shin YK, Lee KM, Lee JS, Yun JH, Lee SM. 2003. An improved protocol of biotinylated tyramine-based immunohistochemistry minimizing nonspecific background staining. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51(1): 131.
- Masruro.Y,2016. Pengecatan Imunohistokimia HER2 Menggunakan susu skim dan normal serum.
- Ramos-Vara, J.A., 2005. *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. *Vet. Pathol.*, 42:405–426.
- Reyes, A., Mahn, A., Herrera, C. and Vasquez, J., 2015. Freeze-drying of Soymilk. *INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD and BIOSYSTEMS ENGINEERING*, p.66.
- Unitly AJA, Sahertian DE. 2010. Deteksi Kandungan Antioksidan Superoksida Dismutase (SOD) pada Organ Ginjal Tikus *Rattus norvegicus* dengan Pewarnaan Imunohistokimia.