

EDITOR  
Dr. dr. Asriati, M.Kes.  
dr. Zida Maulina Aini, M.Ked.Trop., Sp.Rad.



# TEKNIK DAN DASAR **HISTOKIMIA** DAN **IMUNOHISTOKIMIA**

Juliana Christyaningsih  
Ratno Tri Utomo  
Jon Farizal  
Gladies Mercya Grameinie  
Triani Hastuti Hatta  
Anandia Putriyuni  
Fadhil Kurniawan  
Nana Liana  
Ghaniyyatul Khudri  
Patricia Diana Prasetyo  
Meta Zulyati Oktor  
Denys Putra Alim  
Besse Hardianti  
Marliana Nurprilinda  
A.R. Pratiwi Hasanuddin



# TEKNIK DAN DASAR HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

Buku Teknik dan Dasar Histokimia dan Imunohistokimia yang berada di tangan pembaca ini terdiri dari 15 Bab:

- Bab 1 Konsep dan Ruang Lingkup Histokimia dan Imunohistokimia
- Bab 2 Peran Histokimia dan Imunohistokimia dalam Diagnosis Histopatolog
- Bab 3 Prinsip Dasar Histokimia
- Bab 4 Pewarnaan Histokimia
- Bab 5 Pembuatan Preparat Histokimia
- Bab 6 Prinsip Dasar Imunohistokimia: Reaksi Antigen-Antibodi
- Bab 7 Sistem Deteksi Keberadaan Antigen
- Bab 8 Metode Direct dan Indirect dalam Imunohistokimia
- Bab 9 Protokol Imunohistokimia
- Bab 10 Evaluasi Hasil Imuno-Histokimia
- Bab 11 Aplikasi Histokimia dan Imunohistokimia di Bidang Patologi Anatomi
- Bab 12 Aplikasi Histokimia dan Immunohistokimia Bidang Forensik
- Bab 13 Aplikasi Histokimia dan Imunohistokimia Bidang Industri Farmasi
- Bab 14 Kontrol Kualitas dalam Histokimia dan Imunohistokimia
- Bab 15 Tindakan Pencegahan Keselamatan Kerja di Laboratorium Histokimia dan Imunohistokimia



0858 5343 1992  
eurekamediaaksara@gmail.com  
Jl. Banjaran RT.20 RW.10  
Bojongsari - Purbalingga 53362

ISBN 978-634-248-853-5



9

786342

488515

# TEKNIK DAN DASAR HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

Penulis:

Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes.

Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si.

Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med.

Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed.

dr. Triani Hastuti Hatta, Sp. DVE., M.Kes., M.HPE., FINSVDV.

Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA.

dr. Fadhil Kurniawan

dr. Nana Liana, Sp.PA.

dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed.

Dr. dr. Patricia Diana Prasetyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med.

dr. Meta Zulyati Oktora, Sp.PA., M.Biomed.

dr. Denys Putra Alim, Sp.FM.

apt. Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D.

dr. Marlina Nurprilinda, M.H.Kes., FISQua.

A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.

Editor:

Dr. dr. Asriati, M.Kes.

dr. Zida Maulina Aini, M.Ked.Trop., Sp.Rad.



**eureka**  
**media aksara**

PENERBIT CV.EUREKA MEDIA AKSARA

**TEKNIK DAN DASAR  
HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA**

**Penulis** : Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes. | Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si. | Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med. | Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed. | dr. Triani Hastuti Hatta, Sp. DVE., M.Kes., M.HPE., FINSVDV. | Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA. | dr. Fadhil Kurniawan | dr. Nana Liana, Sp.PA. | dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed. | Dr. dr. Patricia Diana Prasetyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med. | dr. Meta Zulyati Oktora, Sp.PA., M.Biomed. | dr. Denys Putra Alim, Sp.FM. | apt. Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D. | dr. Marliana Nurprilinda, M.H.Kes., FISQua. | A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.

**Editor** : Dr. dr. Asriati, M.Kes.  
dr. Zida Maulina Aini, M.Ked.Trop., Sp.Rad.

**Desain Sampul** : Firman Isma'il

**Tata Letak** : Irma Puspitaningrum

**ISBN** : 978-634-248-851-5

Diterbitkan oleh : **EUREKA MEDIA AKSARA,**  
**NOVEMBER 2025**  
**ANGGOTA IKAPI JAWA TENGAH**  
**NO. 225/JTE/2021**

**Redaksi:**

Jalan Banjaran, Desa Banjaran RT 20 RW 10 Kecamatan Bojongsari  
Kabupaten Purbalingga Telp. 0858-5343-1992

Surel : eurekamediaaksara@gmail.com

Cetakan Pertama : 2025

**All right reserved**

Hak Cipta dilindungi undang-undang

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun dan dengan cara apapun, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya tanpa seizin tertulis dari penerbit.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan buku ini. Penulisan buku merupakan buah karya dari pemikiran penulis yang diberi judul “**Teknik dan Dasar Histokimia dan Imunohistokimia**”. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan karya ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih pada semua pihak yang telah membantu penyusunan buku ini. Sehingga buku ini bisa hadir di hadapan pembaca.

Buku ini terbagi menjadi 15 bab yang membahas:

- Bab 1 Konsep dan Ruang Lingkup Histokimia dan Imunohistokimia
- Bab 2 Peran Histokimia dan Imunohistokimia dalam Diagnosis Histopatolog
- Bab 3 Prinsip Dasar Histokimia
- Bab 4 Pewarnaan Histokimia
- Bab 5 Pembuatan Preparat Histokimia
- Bab 6 Prinsip Dasar Imunohistokimia: Reaksi Antigen-Antibodi
- Bab 7 Sistem Deteksi Keberadaan Antigen
- Bab 8 Metode *Direct* dan *Indirect* dalam Imunohistokimia
- Bab 9 Protokol Imunohistokimia
- Bab 10 Evaluasi Hasil Imuno-Histokimia
- Bab 11 Aplikasi Histokimia dan Imunohistokimia di Bidang Patologi Anatomi
- Bab 12 Aplikasi Histokimia dan Immunohistokimia Bidang Forensik
- Bab 13 Aplikasi Histokimia dan Imunohistokimia Bidang Industri Farmasi
- Bab 14 Kontrol Kualitas dalam Histokimia dan Imunohistokimia
- Bab 15 Tindakan Pencegahan Keselamatan Kerja di Laboratorium Histokimia dan Imunohistokimia

Akhir kata penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga buku ini akan membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>v</b>
<b>BAB 1 KONSEP DAN RUANG LINGKUP HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA</b>	
<b>Oleh : Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes.</b> .....	<b>1</b>
A. Sejarah dan Perkembangan Histokimia dan Imunohistokimia .....	1
B. Hubungan dengan Histologi, Sitologi, dan Biologi Molekuler.....	3
C. Konsep Dasar Histokimia.....	4
D. Jenis-Jenis Pewarnaan Histokimia Klasik .....	5
E. Mekanisme Interaksi Zat Kimia dengan Komponen Jaringan.....	7
F. Konsep Dasar Imunohistokimia (IHK).....	8
G. Perbedaan Imunohistokimia, Imunositokimia, dan <i>Immunofluorescence</i> .....	9
H. Kendala Teknis dalam Histokimia dan Imunohistokimia.....	10
I. Interpretasi Hasil dan Kesalahan Umum.....	11
J. <i>Digital Pathology</i> dan <i>Artificial Intelligence</i> dalam Analisis IHK .....	12
K. Arah Perkembangan Masa Depan: <i>Multiplex Staining</i> dan <i>Quantitative IHC</i> .....	13
L. Peran Histokimia dan IHK dalam Kedokteran Modern.....	14
DAFTAR PUSTAKA.....	16
<b>BAB 2 PERAN HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA DALAM DIAGNOSIS HISTOPATOLOG</b>	
<b>Oleh : Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si.</b> .....	<b>18</b>
A. Peran Histokimia dalam Identifikasi Struktur Jaringan dan Penyakit.....	18
B. Imunohistokimia sebagai Pendekatan Modern dalam Diagnosis .....	22
C. Perbandingan Histokimia dan Imunohistokimia dalam Histopatologi.....	24

	D. Histokimia dan Imunohistokimia pada Kasus Spesifik.....	25
	E. Implikasi Klinis dan Prospek Masa Depan.....	28
	DAFTAR PUSTAKA.....	30
<b>BAB 3</b>	<b>PRINSIP DASAR HISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med. ....</b>	<b>31</b>
	A. Pengertian Histokimia .....	31
	B. Manfaat Pewarnaan Histokimia.....	32
	C. Reaksi Pewarnaan Spesifik .....	33
	D. Jenis-Jenis Pewarnaan Histokimia .....	33
	DAFTAR PUSTAKA.....	39
<b>BAB 4</b>	<b>PEWARNAAN HISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed. ....</b>	<b>41</b>
	A. Pendahuluan .....	41
	B. Klasifikasi Teknik Pewarnaan Histokimia.....	42
	C. Pewarnaan Karbohidrat .....	43
	D. Pewarnaan Protein dan Enzim.....	45
	E. Pewarnaan Lipid .....	49
	F. Pewarnaan Asam Nukleat .....	52
	G. Pewarnaan Zat Anorganik.....	55
	H. Pewarnaan Pigmen .....	57
	DAFTAR PUSTAKA.....	60
<b>BAB 5</b>	<b>PEMBUATAN PREPARAT HISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : dr. Triani Hastuti Hatta, Sp. DVE., M.Kes., M.HPE., FINS DV. ....</b>	<b>62</b>
	A. Pendahuluan .....	62
	B. Bahan dan Peralatan .....	63
	C. Tahap-Tahap Pembuatan Preparat Histokimia .....	64
	DAFTAR PUSTAKA.....	73
<b>BAB 6</b>	<b>PRINSIP DASAR IMUNOHISTOKIMIA: REAKSI ANTIGEN-ANTIBODI</b>	
	<b>Oleh : Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA. ....</b>	<b>74</b>
	A. Pendahuluan.....	74
	B. Sejarah Imunohistokimia .....	74
	C. Konsep Reaksi Antigen-Antibodi .....	78
	D. Mekanisme Reaksi Antigen – Antibodi dalam Imunohistokimia .....	80

	E. Pemilihan Antibodi .....	84
	F. Simpulan.....	86
	DAFTAR PUSTAKA.....	87
<b>BAB 7</b>	<b>SISTEM DETEKSI KEBERADAAN ANTIGEN</b>	
	<b>Oleh : dr. Fadhil Kurniawan .....</b>	<b>88</b>
	A. Pendahuluan .....	88
	B. Klasifikasi Sistem Deteksi Antigen .....	89
	C. Komponen Utama dalam Sistem Deteksi.....	97
	D. Perbandingan Sistem Deteksi – Analisis Komparatif Sistem Deteksi Antigen.....	99
	E. Faktor yang Mempengaruhi Kualitas Deteksi.....	101
	DAFTAR PUSTAKA.....	104
<b>BAB 8</b>	<b>METODE <i>DIRECT</i> DAN <i>INDIRECT</i> DALAM IMUNOHISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : dr. Nana Liana, Sp.PA. ....</b>	<b>112</b>
	A. Pendahuluan .....	112
	B. Metode <i>Direct</i> .....	113
	C. Kekurangan Metode <i>Direct</i> .....	115
	D. Kelebihan Metode <i>Direct</i> .....	115
	E. Metode <i>Indirect</i> .....	116
	F. Variasi Metode <i>Indirect</i> .....	117
	DAFTAR PUSTAKA.....	122
<b>BAB 9</b>	<b>PROTOKOL IMUNOHISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed. ....</b>	<b>123</b>
	A. Pendahuluan .....	123
	B. Prinsip Umum Protokol IHK .....	124
	C. Tahapan Protokol Imunohistokimia Umum.....	124
	D. Variasi dan Adaptasi Protokol.....	134
	DAFTAR PUSTAKA.....	136
<b>BAB 10</b>	<b>EVALUASI HASIL IMUNO-HISTOKIMIA</b>	
	<b>Oleh : Dr. dr. Patricia Diana Prasetyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med. ....</b>	<b>137</b>
	A. Pendahuluan .....	137
	B. Faktor yang Mempengaruhi Hasil Imunohistokimia.....	138
	C. Interpretasi Hasil Imunohistokimia.....	140

	D. Analisis Hasil Imunohistokimia.....	143
	DAFTAR PUSTAKA.....	148
<b>BAB 11</b>	<b>APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA DI BIDANG PATOLOGI ANATOMI</b>	
	<b>Oleh : dr. Meta Zulyati Oktora, Sp.PA., M.Biomed....</b>	<b>150</b>
	A. Pendahuluan.....	150
	B. Prinsip Dasar.....	151
	C. Aplikasi Histokimia dalam Patologi Anatomi.....	152
	D. Aplikasi Imunohistokimia dalam Patologi Anatomi.....	154
	E. Integrasi dengan Teknik Modern.....	156
	F. Studi Kasus dan Aplikasi.....	157
	G. Kesimpulan.....	158
	DAFTAR PUSTAKA.....	160
<b>BAB 12</b>	<b>APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMMUNOHISTOKIMIA BIDANG FORENSIK</b>	
	<b>Oleh : dr. Denys Putra Alim, Sp.FM.....</b>	<b>162</b>
	A. Pendahuluan.....	162
	B. Prinsip Dasar Pemeriksaan.....	163
	C. Aplikasi dalam Bidang Forensik.....	165
	D. Kelebihan dan Keterbatasan Pemeriksaan.....	170
	E. Tren Terkini dan Prospek.....	171
	F. Kesimpulan.....	172
	DAFTAR PUSTAKA.....	173
<b>BAB 13</b>	<b>APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA BIDANG INDUSTRI FARMASI</b>	
	<b>Oleh : apt. Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D.....</b>	<b>175</b>
	A. Pendahuluan.....	175
	B. Peran Histokimia dan IHK dalam Diagnosis Modern.....	176
	C. Prinsip Dasar Preparasi Jaringan.....	177
	D. Histokimia: Visualisasi Komponen Kimiawi Jaringan.....	178
	E. Imunohistokimia: Prinsip dan Teknik.....	180

F. Aplikasi Imunohistokimia dalam Diagnosis Tumor (Patologi Diagnostik) .....	182
DAFTAR PUSTAKA.....	185
<b>BAB 14 KONTROL KUALITAS DALAM HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA</b>	
<b>Oleh : dr. Marliana Nurprilinda, M.H.Kes., FISQua. .188</b>	
A. Pendahuluan .....	188
B. Prinsip Dasar Kontrol Kualitas.....	191
C. Aspek-Aspek Kontrol Kualitas .....	193
D. Kualitas Sampel .....	194
E. Kontrol Reagen dan Antibodi.....	198
F. Prosedur Pewarnaan .....	202
G. Interpretasi dan Dokumentasi .....	207
H. Metode Kontrol Kualitas Khusus Imunohistokimia.....	212
I. Implikasi Kontrol Kualitas terhadap Diagnostik .....	217
J. Kesimpulan.....	220
DAFTAR PUSTAKA.....	225
<b>BAB 15 TINDAKAN PENCEGAHAN KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA</b>	
<b>Oleh : A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.....229</b>	
A. Pendahuluan .....	229
B. Pengenalan Risiko di Laboratorium Histokimia dan Imunohistokimia .....	230
C. Pengelolaan Risiko dan Keselamatan Kerja (K3) di Laboratorium.....	231
D. Pencegahan Cedera akibat Bahan Kimia Berbahaya .....	232
E. Pencegahan Cedera Mekanis dan Luka Tusuk .....	233
F. Protokol Penanganan dan Pembuangan Limbah Berbahaya .....	235
G. Pencegahan Paparan Infeksi dan Penyakit Menular.....	237
DAFTAR PUSTAKA.....	239
<b>TENTANG PENULIS .....</b>	<b>241</b>



---

# TEKNIK DAN DASAR HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

**Penulis:**

**Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes.**

**Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si.**

**Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med.**

**Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed.**

**dr. Triani Hastuti Hatta, Sp. DVE., M.Kes., M.HPE., FINSVD.**

**Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA.**

**dr. Fadhil Kurniawan**

**dr. Nana Liana, Sp.PA.**

**dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed.**

**Dr. dr. Patricia Diana Prasetiyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med.**

**dr. Meta Zulyati Oktora, Sp.PA., M.Biomed.**

**dr. Denys Putra Alim, Sp.FM.**

**apt. Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D.**

**dr. Marliana Nurprilinda, M.H.Kes., FISQua.**

**A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.**

**Editor:**

**Dr. dr. Asriati, M.Kes.**

**dr. Zida Maulina Aini, M.Ked.Trop., Sp.Rad.**



# BAB

# 1

## KONSEP DAN RUANG LINGKUP HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes.

### A. Sejarah dan Perkembangan Histokimia dan Imunohistokimia

Keberadaan ilmu Histokimia berasal dari kebutuhan ilmuwan untuk memahami struktur jaringan secara lebih mendalam, tidak hanya melalui pengamatan morfologi dengan mikroskop cahaya, tetapi juga dengan cara mengidentifikasi kandungan kimiawi di dalam sel dan jaringan. Pada akhir abad ke-19, penelitian mulai berkembang dengan ditemukannya berbagai teknik pewarnaan jaringan yang spesifik terhadap komponen tertentu. Misalnya, pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E) yang menjadi dasar histologi, kemudian dikembangkan metode khusus seperti **Periodic Acid-Schiff (PAS)** untuk mendeteksi karbohidrat, **Sudan** untuk lipid, serta **Feulgen reaction** untuk DNA. Dengan cara ini, histokimia memberikan jembatan antara biokimia dan histologi sehingga memungkinkan pemahaman lebih luas mengenai aktivitas metabolik dan distribusi molekul dalam jaringan.

Memasuki abad ke-20, histokimia berkembang pesat dengan diperkenalkannya metode pewarnaan enzimatik yang memungkinkan visualisasi lokasi enzim tertentu dalam sel. Hal ini menjadi tonggak penting karena memberikan gambaran mengenai fungsi seluler secara lebih spesifik. Pada periode ini, histokimia tidak hanya menjadi alat penelitian, tetapi juga mulai digunakan dalam bidang diagnostik, terutama pada penyakit degeneratif, infeksi, dan kanker. Perkembangan berikutnya

ditandai dengan munculnya **imunohistokimia (IHK)** pada tahun 1940–1950-an, setelah ditemukannya mekanisme antigen-antibodi dan teknik pelabelan antibodi dengan penanda enzim atau fluoresen. Inovasi ini dipelopori oleh Albert Coons pada tahun 1941, yang pertama kali menggunakan antibodi berlabel fluoresen untuk mendeteksi antigen dalam jaringan. Penemuan ini membuka era baru dalam ilmu biomedis, karena memungkinkan deteksi molekul spesifik dengan sensitivitas tinggi.

Pada dekade 1970–1980-an, dengan ditemukannya antibodi monoklonal oleh Köhler dan Milstein, imunohistokimia semakin berkembang menjadi metode yang sangat andal. Antibodi monoklonal memungkinkan deteksi yang lebih spesifik terhadap target molekuler, sehingga IHK menjadi teknik utama dalam penelitian kanker, imunologi, dan penyakit infeksi.

Saat ini, histokimia dan imunohistokimia telah bertransformasi seiring dengan kemajuan teknologi mikroskop, sistem deteksi digital, serta integrasi dengan biologi molekuler. Teknik imunohistokimia modern memungkinkan analisis multiparameter (*multiplex IHC*), kuantifikasi digital, dan integrasi dengan data genomik maupun proteomik. Perkembangan ini menjadikan histokimia dan IHK bukan hanya alat penelitian dasar, tetapi juga instrumen diagnostik yang sangat penting dalam kedokteran presisi dan terapi berbasis target.

Di bidang penelitian Biomedis dan Diagnostik, pendekatan secara histokimia dan imunohistokimia memungkinkan peneliti maupun klinisi mengenali distribusi zat tertentu dalam jaringan, sehingga dapat digunakan untuk menilai perubahan metabolik, degeneratif, atau patologis pada berbagai kondisi penyakit. Sementara itu, imunohistokimia (IHK) memberikan kemampuan lebih spesifik dengan memanfaatkan interaksi antigen-antibodi untuk mendeteksi protein atau molekul target tertentu pada jaringan. Dengan teknik ini, peneliti dapat mengidentifikasi marker tumor, menentukan sub tipe sel, atau bahkan mendeteksi agen infeksius

seperti virus dan bakteri. Dalam bidang diagnostik, IHK telah menjadi standar dalam menentukan ekspresi penanda prognostik dan prediktif, misalnya HER2 pada kanker payudara, Ki-67 untuk proliferasi sel, atau p53 dalam analisis mutasi genetik.

Kedua teknik histokimia dan imunohistokimia tidak hanya memperlihatkan gambaran struktural, tetapi juga menyingkap aktivitas biokimia dan ekspresi molekuler yang mendasari suatu penyakit. Hal ini sangat penting dalam mengembangkan terapi target, mengevaluasi efek obat, hingga memahami mekanisme dasar patogenesis sehingga histokimia dan imunohistokimia menjadi pilar utama dalam penelitian biomedis modern sekaligus sarana diagnostik yang krusial untuk menunjang pelayanan kesehatan berbasis bukti.

## **B. Hubungan dengan Histologi, Sitologi, dan Biologi Molekuler**

Histokimia dan imunohistokimia merupakan bagian integral dari ilmu biomedis yang tidak dapat dipisahkan dari histologi, sitologi, dan biologi molekuler. Keempat disiplin ilmu ini saling melengkapi dalam memberikan gambaran menyeluruh mengenai struktur, fungsi, serta dinamika sel dan jaringan.

Dalam **histologi**, fokus utama adalah pengkajian struktur jaringan secara mikroskopis. Analisis ini pada dasarnya bersifat morfologis dan deskriptif, sehingga terbatas pada bentuk serta susunan sel. Histokimia kemudian hadir untuk melengkapi aspek morfologi dengan mengungkap komposisi kimiawi jaringan, misalnya distribusi karbohidrat, protein, lipid, atau asam nukleat. Dengan demikian, histokimia memungkinkan pemahaman lebih mendalam tentang fungsi jaringan melalui deteksi spesifik zat kimia yang tidak dapat diamati hanya dengan teknik histologi konvensional.

**Sitologi**, sebagai ilmu yang mempelajari sel secara individual, juga memiliki keterkaitan erat dengan imunohistokimia. Sitologi mampu menampilkan morfologi sel tunggal, tetapi interpretasi fungsional memerlukan pendekatan

tambahan. Imunohistokimia menjawab kebutuhan ini melalui identifikasi antigen, protein, maupun penanda proliferasi pada sel. Kombinasi sitologi dan imunohistokimia terbukti sangat bermanfaat dalam diagnosis penyakit, misalnya dalam menentukan jenis dan derajat keganasan pada neoplasma.

Sementara itu, **biologi molekuler** memberikan dasar pengetahuan mengenai mekanisme genetik, ekspresi protein, dan regulasi molekuler di dalam sel. Temuan biologi molekuler sering kali bersifat abstrak karena hanya menggambarkan ekspresi gen atau produk protein tanpa menunjukkan konteks spasial di jaringan. Pada titik ini, imunohistokimia berperan sebagai jembatan yang menghubungkan informasi molekuler dengan morfologi sel dan jaringan, sebab teknik ini memungkinkan visualisasi langsung protein hasil ekspresi gen pada jaringan utuh. Dengan cara tersebut, data molekuler dapat divalidasi dalam konteks struktural dan fungsional yang nyata.

Oleh karena itu, hubungan antara histologi, sitologi, histokimia, imunohistokimia, dan biologi molekuler membentuk suatu kerangka integratif. Histologi dan sitologi memberikan gambaran morfologi dasar, histokimia menambahkan informasi mengenai distribusi zat kimiawi, imunohistokimia memungkinkan deteksi protein spesifik, dan biologi molekuler menyediakan landasan mekanistik yang lebih mendalam. Sinergi keempat bidang ini menghasilkan pemahaman komprehensif mengenai proses biologis, baik pada keadaan fisiologis maupun patologis, yang sangat penting dalam penelitian biomedis maupun aplikasi klinis modern.

### C. Konsep Dasar Histokimia

Kata “histokimia” berasal dari gabungan kata “histo” yang berarti jaringan dan “chemistry” yang berarti kimia. Dengan demikian, histokimia memadukan prinsip histologi dan kimia untuk mengidentifikasi komponen kimia dalam sel dan jaringan, seperti karbohidrat, protein, lipid, asam nukleat, serta enzim. Prinsip dasar histokimia adalah memanfaatkan interaksi spesifik antara molekul pewarna atau reagen kimia dengan zat

target dalam jaringan. Zat kimia tersebut dapat berupa senyawa alami jaringan atau enzim yang memiliki aktivitas katalitik tertentu. Pewarnaan histokimia dapat bersifat langsung, di mana zat pewarna bereaksi langsung dengan komponen jaringan, atau tidak langsung, menggunakan mediator kimia untuk memperkuat sinyal pewarnaan. Selain itu, prinsip histokimia juga memperhatikan integritas jaringan yang diproses. Agar hasil pewarnaan akurat, jaringan harus difiksasi untuk mencegah degradasi, dipotong menjadi irisan tipis untuk penetrasi reagen yang optimal, dan dikontrol kondisi pH serta suhu saat reaksi pewarnaan berlangsung. Histokimia tidak hanya menekankan identifikasi zat, tetapi juga mempertahankan struktur morfologi jaringan agar hubungan anatomi dan lokasi zat dapat dipelajari secara tepat.

#### **D. Jenis-Jenis Pewarnaan Histokimia Klasik**

Histokimia klasik merupakan teknik pewarnaan jaringan yang digunakan untuk mengidentifikasi dan memvisualisasikan komponen seluler maupun molekuler tertentu secara spesifik. Pewarnaan histokimia klasik dapat dikategorikan berdasarkan jenis biomolekul yang dideteksi, antara lain karbohidrat, lipid, protein, dan asam nukleat.

##### **1. Pewarnaan Karbohidrat**

Pewarnaan ini bertujuan untuk mendeteksi glikogen, mukopolisakarida, atau glikoprotein dalam jaringan. Salah satu teknik yang paling sering digunakan adalah *Periodic Acid-Schiff (PAS)*. PAS bekerja dengan mengoksidasi gugus hidroksil pada karbohidrat menjadi aldehid, yang kemudian bereaksi dengan fuksin Schiff menghasilkan warna magenta yang khas. Pewarnaan ini penting untuk mengidentifikasi mukus, membran basal, dan akumulasi glikogen pada hati atau otot.

##### **2. Pewarnaan Lipid**

Deteksi lipid dalam jaringan memerlukan pewarnaan yang larut dalam lemak, karena lipid sering hilang selama proses dehidrasi pada preparat parafin. Pewarnaan klasik

untuk lipid termasuk *Sudan III*, *Sudan IV*, *Oil Red O*, dan *Nile Red*, yang menghasilkan warna merah hingga oranye untuk lipid netral, sedangkan lipoprotein tertentu dapat menunjukkan intensitas yang berbeda. Teknik ini banyak digunakan dalam studi jaringan hati, jaringan adiposa, dan aterosklerosis.

### 3. Pewarnaan Protein

Pewarnaan protein menekankan deteksi struktur seluler yang kaya protein, termasuk enzim dan serat kontraktil. Pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue* atau *Mercuric Bromophenol Blue* dapat digunakan untuk melihat protein secara umum. Selain itu, pewarnaan enzim histokimia, seperti **alkalin fosfatase** dan **peroksidase**, memungkinkan visualisasi aktivitas enzim spesifik di dalam sel, yang berfungsi sebagai indikator fungsional jaringan.

### 4. Pewarnaan Asam Nukleat

Asam nukleat, DNA dan RNA, dapat dideteksi menggunakan pewarnaan seperti *Feulgen reaction* untuk DNA dan *Methyl Green-Pyronin* untuk RNA. Reaksi Feulgen menghasilkan warna ungu kemerahan pada inti sel yang mengandung DNA, sementara *Methyl Green-Pyronin* membedakan DNA (hijau) dan RNA (merah) dalam sitoplasma dan nukleus. Pewarnaan ini sangat berguna untuk studi siklus sel, proliferasi, dan diagnosis neoplasia.

Secara keseluruhan, pewarnaan histokimia klasik memberikan dasar yang kuat bagi para peneliti dan dokter patologi untuk memahami struktur, distribusi, dan fungsi biomolekul dalam jaringan. Meskipun sekarang banyak teknik modern berbasis imunohistokimia dan molekuler, pewarnaan klasik tetap menjadi metode penting karena kesederhanaan, spesifisitas, dan kemampuan visualisasinya yang langsung.

## E. Mekanisme Interaksi Zat Kimia dengan Komponen Jaringan

Mekanisme interaksi ini didasarkan pada prinsip **ikatan kimia dan afinitas molekuler** antara pewarna dengan target biokimia dalam sel atau matriks ekstraseluler. Secara umum, mekanisme interaksi dapat dibagi menjadi beberapa jenis:

### 1. Ikatan Ionik (*Electrostatic Interaction*)

Banyak pewarna bersifat bermuatan positif atau negatif yang dapat menempel pada molekul bermuatan lawan. Misalnya, pewarna basofilik seperti hematoksilin bermuatan positif akan berikatan dengan asam nukleat (DNA dan RNA) yang bermuatan negatif. Interaksi ini bersifat reversibel dan bergantung pada pH serta kekuatan ionik larutan.

### 2. Ikatan Hidrogen (*Hydrogen Bonding*)

Pewarna tertentu dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus fungsional dalam protein, karbohidrat, atau lipid. Misalnya, pewarna *Periodic Acid-Schiff* (PAS) bereaksi dengan gugus aldehida pada polisakarida membentuk ikatan yang stabil sehingga karbohidrat dalam jaringan dapat terdeteksi.

### 3. Ikatan Kovalen (*Covalent Bonding*)

Beberapa reagen histokimia dapat membentuk ikatan kovalen dengan target jaringan, memberikan tanda yang permanen dan tahan terhadap pencucian. Contohnya, fiksasi dengan formaldehida menghasilkan ikatan silang antara protein dan aldehida, sehingga struktur jaringan tetap terjaga saat pewarnaan dilakukan.

### 4. Interaksi Afinitas Spesifik (*Affinity Binding*)

Interaksi ini terjadi ketika molekul pewarna atau antibodi memiliki afinitas tinggi terhadap target spesifik. Dalam imunohistokimia, antibodi mengenali antigen tertentu pada sel atau matriks, sehingga pewarna yang dilabeli pada antibodi menandai lokasi antigen secara presisi.

## 5. Reaksi Enzimatik

Beberapa teknik histokimia menggunakan reaksi enzimatik untuk menghasilkan produk yang terlihat secara mikroskopik. Misalnya, enzim fosfatase dalam sel dapat mengubah substrat menjadi endapan berwarna, menandai lokasi enzim tersebut.

Mekanisme ini sering bekerja secara bersamaan, dan efektivitas pewarnaan dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti **pH, suhu, kekuatan ionik, serta kondisi fiksasi dan preparasi jaringan.**

## F. Konsep Dasar Imunohistokimia (IHK)

### Definisi Imunohistokimia (IHK)

Imunohistokimia adalah cabang ilmu histologi yang memanfaatkan interaksi spesifik antara antigen dan antibodi untuk mendeteksi dan memvisualisasikan molekul tertentu dalam jaringan atau sel. Teknik ini menggabungkan prinsip imunologi dan histologi untuk menandai protein, enzim, hormon, atau antigen lain pada lokasi spesifik dalam jaringan. Dengan demikian, IHK memungkinkan peneliti atau dokter untuk tidak hanya mengidentifikasi keberadaan suatu molekul, tetapi juga menentukan distribusi dan intensitas ekspresinya dalam konteks struktur jaringan.

### Prinsip Kerja Imunohistokimia

Prinsip dasar imunohistokimia didasarkan pada afinitas spesifik antibodi terhadap antigen target. Proses ini dimulai dengan persiapan jaringan melalui fiksasi untuk mempertahankan morfologi seluler dan antigenisitas. Selanjutnya, antibodi primer yang spesifik terhadap antigen diterapkan pada jaringan. Antibodi ini akan mengikat antigen secara selektif. Untuk memperjelas keberadaan ikatan ini, digunakan sistem deteksi yang dilengkapi dengan label, baik enzimatik seperti horseradish peroxidase (HRP) maupun fluoresen. Reaksi enzim dengan substrat atau sinyal fluoresen menghasilkan warna atau cahaya yang dapat diamati menggunakan mikroskop. Intensitas sinyal mencerminkan

jumlah antigen yang ada, sehingga memungkinkan analisis kualitatif maupun semi-kuantitatif. Dengan prinsip ini, imunohistokimia menjadi alat penting dalam diagnostik patologi, penelitian kanker, studi perkembangan sel, dan identifikasi agen infeksi, karena teknik ini memadukan spesifisitas imunologi dengan ketelitian histologis.

### **G. Perbedaan Imunohistokimia, Imunositokimia, dan Immunofluorescence**

Imunohistokimia (IHK), imunositokimia (ICC), dan immunofluorescence (IF) adalah teknik berbasis interaksi antigen-antibodi yang digunakan untuk mendeteksi molekul spesifik dalam sel atau jaringan, namun ketiganya memiliki perbedaan mendasar dari segi aplikasi, sampel, dan metode deteksi.

**Imunohistokimia (IHK)** adalah teknik yang diterapkan pada **jaringan utuh** – biasanya jaringan yang telah difiksasi dan diproses menjadi preparat histologi. Tujuan IHK adalah untuk menentukan lokasi dan distribusi molekul target dalam konteks arsitektur jaringan. Deteksi pada IHK umumnya menggunakan antibodi yang diberi label enzim, seperti peroksidase, yang menghasilkan endapan berwarna sehingga dapat diamati dengan mikroskop cahaya. IHK banyak digunakan dalam diagnostik penyakit, misalnya untuk mengidentifikasi penanda tumor pada biopsi jaringan.

**Imunositokimia (ICC)**, di sisi lain, diterapkan pada **sel yang diisolasi atau kultur sel**. ICC memungkinkan peneliti untuk mendeteksi molekul spesifik pada tingkat sel tunggal dan mengamati distribusi subseluler, seperti inti, sitoplasma, atau membran sel. Sama seperti IHK, ICC bisa menggunakan antibodi berlabel enzim, namun karena sampel berupa sel, teknik ini lebih fleksibel untuk studi mekanisme seluler, ekspresi protein, atau efek obat pada kultur sel.

**Immunofluorescence (IF)** adalah metode deteksi yang menggunakan **antibodi berlabel fluoresen**. IF dapat diterapkan pada jaringan atau sel, sehingga dapat dianggap sebagai teknik

yang menggabungkan prinsip IHK dan ICC. Kelebihan IF adalah kemampuannya untuk visualisasi **lebih sensitif dan spesifik**, termasuk kemampuan untuk melakukan *multicolor staining* guna mendeteksi beberapa antigen sekaligus. Deteksi dilakukan menggunakan mikroskop fluoresen, bukan mikroskop cahaya biasa. IF sangat populer dalam penelitian molekuler, studi jalur sinyal, dan visualisasi protein dalam sel hidup. Singkatnya, perbedaan utama terletak pada:

1. **Jenis sampel:** IHK → jaringan; ICC → sel; IF → sel atau jaringan.
2. **Metode deteksi:** IHK & ICC klasik → label enzim (endapan berwarna); IF → label fluoresen.
3. **Tujuan aplikasi:** IHK → konteks jaringan; ICC → distribusi subseluler; IF → sensitivitas tinggi dan deteksi multipel antigen.

#### H. Kendala Teknis dalam Histokimia dan Imunohistokimia

Histokimia dan imunohistokimia (IHK) merupakan teknik yang sangat bergantung pada kualitas jaringan, reagen, dan prosedur laboratorium. Kendala teknis dalam kedua metode ini dapat muncul pada hampir setiap tahap proses, mulai dari persiapan sampel hingga interpretasi hasil. Salah satu masalah yang paling umum adalah **fiksasi jaringan yang tidak optimal**. Fiksasi yang terlalu lama atau terlalu singkat dapat merusak struktur seluler dan mengubah epitop antigen, sehingga mengurangi intensitas pewarnaan atau bahkan menghasilkan hasil negatif palsu pada IHK.

Selain itu, **proses pemotongan jaringan (sectioning)** juga dapat menimbulkan kendala. Potongan yang terlalu tebal atau tidak rata dapat menyebabkan penetrasi pewarna atau antibodi yang tidak merata, menghasilkan pewarnaan yang tidak konsisten. Pada histokimia klasik, reaksi enzim atau kimia bisa terganggu oleh **kontaminasi reagen atau pH yang tidak sesuai**, sehingga hasil pewarnaan menjadi lemah atau sulit diinterpretasikan.

Dalam imunohistokimia, kendala sering timbul dari **kualitas antibodi dan teknik deteksi**. Antibodi yang tidak spesifik atau rusak dapat menimbulkan latar belakang tinggi (background staining) atau cross-reactivity dengan antigen lain, sehingga interpretasi menjadi ambigu. Selain itu, beberapa antigen bersifat **sensitif terhadap fiksasi formalin** dan memerlukan antigen retrieval untuk memperlihatkan epitop, menambah kompleksitas teknik.

Faktor lain adalah **standarisasi prosedur dan reproducibility**, terutama jika laboratorium menggunakan metode yang berbeda atau staf dengan tingkat pengalaman berbeda. Perbedaan suhu inkubasi, durasi pewarnaan, atau konsentrasi reagen dapat menghasilkan variasi hasil yang signifikan. Akhirnya, interpretasi hasil pewarnaan juga menuntut pengalaman dan pengetahuan anatomi yang baik, karena pewarnaan yang salah atau artefak jaringan dapat menyesatkan diagnosa.

Dengan memahami kendala teknis ini, peneliti dan praktisi laboratorium dapat menerapkan **kontrol kualitas yang ketat**, memperbaiki prosedur, dan memastikan hasil histokimia dan IHK yang lebih akurat dan dapat diandalkan.

## **I. Interpretasi Hasil dan Kesalahan Umum**

Interpretasi hasil histokimia dan imunohistokimia (IHK) merupakan tahap krusial yang menentukan validitas temuan penelitian maupun diagnosis klinis. Pada prinsipnya, hasil pewarnaan harus dianalisis berdasarkan pola, intensitas, dan lokasi sinyal dalam jaringan atau sel. Misalnya, pewarnaan positif pada inti sel atau sitoplasma harus sesuai dengan distribusi biologis antigen atau enzim yang ditargetkan. Penting juga membandingkan hasil dengan kontrol positif dan negatif untuk memastikan bahwa sinyal yang terlihat memang spesifik dan bukan artefak.

Kesalahan umum dalam interpretasi dapat muncul dari berbagai sumber. Salah satu kesalahan yang sering terjadi adalah false positive, yaitu munculnya sinyal pewarnaan pada area

yang seharusnya negatif, yang biasanya disebabkan oleh ikatan nonspesifik antibodi, fiksasi jaringan yang tidak optimal, atau prosedur pencucian yang kurang teliti. Sebaliknya, *false negative* terjadi ketika target sebenarnya ada tetapi tidak terdeteksi, yang bisa disebabkan oleh degradasi antigen selama fiksasi, pengenceran antibodi yang terlalu tinggi, atau teknik deteksi yang kurang sensitif. Kesalahan lain termasuk overinterpretasi intensitas pewarnaan atau mengabaikan heterogenitas jaringan, yang dapat menyesatkan analisis kuantitatif dan kesimpulan klinis.

Untuk meminimalkan kesalahan tersebut, peneliti atau ahli patologi harus memperhatikan standar prosedur, menggunakan kontrol yang tepat, dan memahami konteks biologis dari jaringan yang dianalisis. Evaluasi yang hati-hati dan sistematis, termasuk verifikasi dengan metode tambahan bila diperlukan, akan meningkatkan akurasi interpretasi dan mendukung kesimpulan yang sah dalam penelitian maupun praktik klinis.

#### **J. *Digital Pathology* dan *Artificial Intelligence* dalam Analisis IHK**

Perkembangan teknologi digital telah membawa transformasi signifikan dalam bidang histopatologi, termasuk imunohistokimia (IHK). *Digital pathology* atau patologi digital adalah proses pemindaian preparat jaringan menjadi citra digital resolusi tinggi yang dapat dianalisis, disimpan, dan dibagikan secara elektronik. Dengan digitalisasi ini, proses evaluasi preparat IHK menjadi lebih efisien, memungkinkan kolaborasi jarak jauh, pengarsipan yang aman, dan akses yang lebih cepat terhadap data diagnostik.

Selain itu, integrasi *artificial intelligence (AI)* dalam *digital pathology* membuka peluang untuk meningkatkan akurasi, objektivitas, dan reproducibility analisis IHK. AI dapat dilatih untuk mengenali pola-pola spesifik pada jaringan yang mengekspresikan antigen tertentu, menghitung ekspresi protein secara kuantitatif, serta mengidentifikasi sel abnormal yang

mungkin sulit dideteksi secara manual. Algoritme AI, seperti deep learning, memungkinkan analisis multiplex staining dengan presisi tinggi, mempercepat proses evaluasi, dan mengurangi bias subjektif pemeriksa.

Penggunaan *digital pathology* dan AI juga memiliki manfaat klinis yang luas, termasuk identifikasi biomarker kanker, prediksi respons terapi, dan pemantauan progresi penyakit. Di sisi penelitian, teknologi ini memungkinkan analisis jaringan dalam skala besar (*high-throughput*) dan integrasi data histopatologi dengan informasi genomik atau proteomik. Meski demikian, tantangan seperti standar digitalisasi, validasi algoritme, dan regulasi etis tetap menjadi perhatian penting dalam implementasinya.

#### K. Arah Perkembangan Masa Depan: *Multiplex Staining* dan *Quantitative IHC*

Perkembangan teknologi histokimia dan imunohistokimia (IHC) terus bergerak menuju analisis yang lebih kompleks, akurat, dan kuantitatif. Salah satu inovasi utama adalah **multiplex staining**, yaitu teknik pewarnaan simultan beberapa antigen pada satu preparat jaringan. Dengan metode ini, peneliti dapat memvisualisasikan interaksi antar sel, jalur sinyal, atau distribusi beberapa penanda sekaligus dalam konteks jaringan yang sama. Multiplex staining tidak hanya menghemat sampel dan reagen, tetapi juga memungkinkan analisis hubungan spasial antar berbagai jenis sel, yang sangat penting dalam penelitian kanker, imunologi, dan jaringan regeneratif.

Selain itu, tren *quantitative IHC* semakin berkembang untuk memberikan data yang objektif dan terukur. Alih-alih sekadar observasi kualitatif berdasarkan intensitas pewarnaan, quantitative IHC memanfaatkan perangkat lunak analisis citra digital untuk menghitung ekspresi antigen secara presisi. Pendekatan ini meningkatkan reproducibility dan memungkinkan evaluasi ekspresi protein dalam skala yang lebih besar, termasuk pengukuran densitas, luas area, dan distribusi

seluler. Kombinasi antara *multiplex staining* dan *quantitative IHC* membuka peluang baru dalam penelitian translasi dan klinis, seperti penentuan biomarker prognosis, respons terapi target, dan pemetaan profil imun mikro-lingkungan tumor.

Dengan integrasi teknologi digital dan algoritma canggih, masa depan histokimia dan imunohistokimia akan semakin bergeser dari interpretasi visual manual menjadi **analisis data multidimensional yang presisi**, memberikan kontribusi signifikan dalam diagnosis, penelitian biomedis, dan pengembangan terapi personalisasi.

#### L. Peran Histokimia dan IHC dalam Kedokteran Modern

Peran histokimia dan IHC semakin vital ketika kedokteran modern bergerak ke arah *personalized medicine*. Histokimia memberikan dasar pemahaman struktur dan fungsi jaringan, sedangkan IHC menghadirkan analisis molekuler yang lebih spesifik. Kombinasi keduanya tidak hanya meningkatkan akurasi diagnosis, tetapi juga memungkinkan penentuan strategi terapi yang lebih individual, sesuai profil biologis pasien. Dengan perkembangan teknologi *digital pathology* dan integrasi dengan kecerdasan buatan (AI), analisis histokimia dan IHC kini dapat dilakukan secara lebih cepat, akurat, dan kuantitatif. Hal ini menjadikan keduanya sebagai pilar penting dalam penelitian biomedis, diagnostik klinis, serta pengembangan terapi inovatif di era kedokteran presisi.

Imunohistokimia membawa analisis jaringan ke tingkat yang lebih spesifik dengan memanfaatkan antibodi terhadap penanda molekuler tertentu. Contohnya, pada kasus kanker payudara, IHC digunakan untuk mendeteksi ekspresi protein HER2, estrogen receptor (ER), dan progesterone receptor (PR). Pasien dengan kanker payudara HER2-positif dapat memperoleh terapi target seperti trastuzumab, yang secara signifikan meningkatkan respons terapi dan prognosis. Dalam kasus limfoma, IHC memungkinkan identifikasi subtipe sel B atau T dengan menggunakan penanda CD20 atau CD3, yang menjadi dasar keputusan pengobatan kemoterapi spesifik.

Selain onkologi, IHK juga digunakan dalam diagnosis infeksi dan penyakit autoimun. Misalnya, deteksi antigen virus hepatitis B (HBsAg) dalam jaringan hati pasien hepatitis kronis membantu konfirmasi diagnosis sekaligus memantau respons terhadap terapi antiviral. Pada biopsi ginjal pasien dengan glomerulonefritis, IHK dapat menunjukkan deposisi imunoglobulin atau komplemen pada glomerulus, yang sangat penting untuk menegakkan diagnosis dan menentukan regimen imunomodulator.

Kombinasi histokimia dan IHK semakin krusial dalam era *personalized medicine*, karena memungkinkan evaluasi simultan struktur, fungsi, dan ekspresi molekuler jaringan pasien. Dukungan teknologi digital pathology dan analisis kuantitatif berbasis AI mempercepat interpretasi hasil, mengurangi subjektivitas, dan meningkatkan akurasi diagnosis. Dengan demikian, kedua teknik ini tidak hanya menjadi alat diagnostik yang akurat, tetapi juga menjadi panduan bagi terapi individual, penelitian biomedis, dan pengembangan strategi pengobatan inovatif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chen, F., Zhang, R., Zheng, B., Sun, Y., He, J., & Qin, W. (2024, October). Pathological semantics-preserving learning for H&E-to-IHC virtual staining. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (pp. 384-394). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Crager, M., Wijayawardana, S. R., Gruver, A. M., Blacklock, A., Baehner, F. L., Russell, C., & Sapunar, F. J. (2022). Correlation of the oncotype DX breast recurrence score and the ki-67 IHC MIB-1 pharmDX score in HR+, HER2-, node-positive early breast cancer.
- Da Costa Nunes, E. H., Ribeiro, G. V., Monteiro, I. T., & Gonçalves, E. (2023, October). Digital accessibility at the brazilian symposium on human factors in computing systems (IHC): An updated systematic literature review. In *Proceedings of the XXII Brazilian Symposium on Human Factors in Computing Systems* (pp. 1-15).
- Guerin, C. J. (2023). Using antibodies in microscopy: a guide to immunohistochemistry. Part 2: IHC staining protocols. *Microscopy Today*, 31(3), 34-39.
- Harms, P. W., Frankel, T. L., Moutafi, M., Rao, A., Rimm, D. L., Taube, J. M., ... & Pantanowitz, L. (2023). Multiplex immunohistochemistry and immunofluorescence: a practical update for pathologists. *Modern Pathology*, 36(7), 100197.
- Kapadia, M., Khojasteh, M., Kouzova, M., Jones, C., Xu, X. M., Olson, M. T., ... & Guetter, C. (2022). Abstract P1-02-17: Artificial intelligence-based whole slide scoring of nuclear breast cancer IHC markers Ki67, ER, and PR matches performance of manual clinical scoring. *Cancer Research*, 82(4\_Supplement), P1-02.

- Klößner, P., Teixeira, J., Montezuma, D., Fraga, J., Horlings, H. M., Cardoso, J. S., & Oliveira, S. P. (2025). H&E to IHC virtual staining methods in breast cancer: an overview and benchmarking. *npj Digital Medicine*, 8(1), 384.
- Li, M., Lv, H., Zhao, Y., Zhu, C., Li, H., Lin, M., & Yang, W. T. (2024). Abstract PO4-26-09: The Advantage of Artificial-Intelligence in HER2 IHC 0 and 1+ Scoring in Breast Cancer. *Cancer Research*, 84(9\_Supplement), PO4-26.
- Lim, M. J., Yagnik, G., Henkel, C., Frost, S. F., Bien, T., & Rothschild, K. J. (2023). MALDI HiPLEX-IHC: multiomic and multimodal imaging of targeted intact proteins in tissues. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1182404.
- Nakkireddy, S. R., Jang, I., Kim, M., Yin, L. X., Rivera, M., Garcia, J. J., ... & Hwang, T. H. (2024). Integrative analysis of H&E and IHC identifies prognostic immune subtypes in HPV related oropharyngeal cancer. *Communications Medicine*, 4(1), 190.
- Taube, J. M., Sunshine, J. C., Angelo, M., Akturk, G., Eminizer, M., Engle, L. L., ... & Bifulco, C. B. (2025). Society for Immunotherapy of Cancer: updates and best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) image analysis and data sharing. *Journal for immunotherapy of cancer*, 13(1), e008875.

# BAB 2

## PERAN HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA DALAM DIAGNOSIS HISTOPATOLOG

Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si.

### A. Peran Histokimia dalam Identifikasi Struktur Jaringan dan Penyakit

Histokimia adalah teknik yang digunakan untuk mempelajari struktur dan fungsi jaringan pada tingkat molekuler. Peran histokimia dalam identifikasi struktur jaringan dan penyakit adalah sebagai berikut :

#### 1. Identifikasi struktur jaringan

Histokimia dapat membantu mengidentifikasi struktur jaringan dengan menggunakan teknik pewarnaan yang spesifik untuk komponen jaringan tertentu. Identifikasi struktur jaringan melibatkan analisis struktur dan komponen jaringan untuk memahami fungsi dan patologi jaringan. Beberapa teknik yang digunakan dalam identifikasi struktur jaringan adalah:

- a. Histologi: Studi tentang struktur jaringan dengan menggunakan mikroskop cahaya.
- b. Pewarnaan histokimia: Teknik pewarnaan yang digunakan untuk mendeteksi komponen jaringan tertentu.
- c. Imunohistokimia: Teknik yang digunakan untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan.

Dengan identifikasi struktur jaringan, dapat dipahami:

- a. Struktur normal: Struktur jaringan normal dan fungsi jaringan.

- b. Perubahan patologis: Perubahan struktur jaringan yang terkait dengan penyakit.
- c. Diagnostik penyakit: Identifikasi struktur jaringan dapat membantu dalam diagnosis penyakit.

Identifikasi struktur jaringan sangat penting dalam bidang patologi, penelitian biomedis, dan diagnosis penyakit.

## **2. Deteksi perubahan patologis**

Histokimia dapat membantu mendeteksi perubahan patologis pada jaringan, seperti perubahan pada struktur sel atau jaringan yang terkait dengan penyakit. Deteksi perubahan patologis adalah proses identifikasi perubahan struktur atau fungsi jaringan yang terkait dengan penyakit. Perubahan patologis dapat berupa:

- a. Perubahan struktur sel: Perubahan bentuk, ukuran, atau jumlah sel.
- b. Perubahan jaringan: Perubahan struktur atau komposisi jaringan.
- c. Perubahan molekuler: Perubahan ekspresi gen atau protein.

## **3. Diagnostik penyakit**

Histokimia dapat digunakan sebagai alat diagnostik untuk mengidentifikasi penyakit, seperti kanker, dengan mendeteksi perubahan pada struktur jaringan atau ekspresi molekul tertentu.

## **4. Penelitian penyakit**

Histokimia dapat digunakan dalam penelitian penyakit untuk memahami mekanisme penyakit dan mengembangkan terapi yang lebih efektif.

Dengan demikian, histokimia memainkan peran penting dalam memahami struktur dan fungsi jaringan, serta dalam diagnosis dan penelitian penyakit. Penerapan pewarnaan khusus dalam diagnosis penyakit jaringan juga termasuk merupakan beberapa identifikasi dalam

menentukan struktur dan identifikasi penyakit, adapun diantaranya adalah sebagai berikut:

**a. PAS (*Periodic Acid-Schiff*)**

*Periodic Acid-Schiff* adalah teknik pewarnaan histokimia yang digunakan untuk mendeteksi karbohidrat dan glikoprotein dalam jaringan. PAS digunakan untuk mendeteksi glikogen dalam sel dan jaringan, mendeteksi polisakarida lainnya, seperti glikoprotein dan mukopolisakarida. Serta diagnostik penyakit yang terkait dengan akumulasi karbohidrat, seperti penyakit penyimpanan glikogen.

PAS merupakan teknik yang berguna dalam patologi dalam diagnosis penyakit jaringan dan organ. Serta untuk penelitian seperti penelitian biomedis untuk mempelajari struktur dan fungsi jaringan.

Dengan menggunakan PAS, peneliti dan dokter dapat memahami lebih baik tentang struktur dan fungsi jaringan, serta mendiagnosis penyakit yang terkait dengan karbohidrat

**b. Trikrom**

Trikrom adalah teknik pewarnaan histokimia yang digunakan untuk mendeteksi kolagen dan jaringan ikat lainnya dalam jaringan. Trikrom digunakan untuk mendeteksi kolagen dalam jaringan ikat, mendeteksi mendeteksi fibrosis, yaitu penumpukan kolagen yang berlebihan dalam jaringan. Selain itu Trikrom juga dapat digunakan sebagai diagnostik penyakit yang terkait dengan fibrosis, seperti sirosis hati dan fibrosis paru.

Trikrom merupakan teknik yang berguna dalam:

- 1) Patologi : Trikrom digunakan dalam diagnosis penyakit jaringan dan organ.
- 2) Penelitian: Trikrom digunakan dalam penelitian biomedis untuk mempelajari struktur dan fungsi jaringan ikat.

Dengan menggunakan Trikrom, peneliti dan tenaga medis/dokter dapat memahami lebih baik tentang struktur dan fungsi jaringan ikat, serta mendiagnosis penyakit yang terkait dengan fibrosis.

**c. Sudan**

Pewarnaan Sudan adalah teknik pewarnaan histokimia yang digunakan untuk mendeteksi lipid dan lemak dalam jaringan. Pewarnaan Sudan digunakan untuk mendeteksi lipid dan lemak dalam sel dan jaringan, mendiagnostik penyakit yang terkait dengan akumulasi lipid, seperti penyakit penyimpanan lipid.

Pewarnaan Sudan merupakan teknik yang berguna dalam:

- 1) Patologi: Pewarnaan Sudan digunakan dalam diagnosis penyakit jaringan dan organ.
- 2) Penelitian: Pewarnaan Sudan digunakan dalam penelitian biomedis untuk mempelajari struktur dan fungsi lipid dalam jaringan.

Dengan menggunakan pewarnaan Sudan, peneliti dan dokter dapat memahami lebih baik tentang struktur dan fungsi lipid dalam jaringan, serta mendiagnosis penyakit yang terkait dengan akumulasi lipid.

**d. Pewarnaan lainnya**

Pewarnaan lainnya seperti Masson, Giemsa, dan lain-lain, yang digunakan untuk mendeteksi struktur jaringan dan perubahan patologis lainnya. Pewarnaan khusus ini membantu dalam hal :

- 1) Mendiagnosis penyakit: Dengan mendeteksi perubahan patologis pada jaringan.
- 2) Mengidentifikasi jenis penyakit: Dengan mendeteksi komponen jaringan yang spesifik.
- 3) Menentukan tingkat keparahan penyakit: Dengan mengevaluasi luas dan intensitas perubahan patologis.

Dengan demikian, pewarnaan khusus memainkan peran penting dalam diagnosis penyakit jaringan dan membantu dalam penentuan diagnosis yang akurat

Histokimia dapat membantu membedakan lesi jinak dan ganas dengan :

- 1) Mendeteksi biomarker: Histokimia dapat mendeteksi biomarker spesifik yang terkait dengan lesi ganas.
- 2) Menganalisis struktur jaringan: Histokimia dapat menganalisis struktur jaringan dan mendeteksi perubahan patologis yang terkait dengan lesi ganas.
- 3) Mengidentifikasi protein spesifik: Histokimia dapat mengidentifikasi protein spesifik yang terkait dengan lesi ganas.

Dengan demikian, histokimia dapat membantu mendiagnostik yang akurat antara lesi jinak dan ganas, membantu dalam menentukan prognosis pasien dengan lesi ganas dan membantu dalam menentukan pengobatan yang tepat untuk lesi ganas.

Histokimia merupakan alat yang berguna dalam patologi untuk membedakan lesi jinak dan ganas, sehingga dapat membantu dalam pengelolaan pasien yang lebih efektif.

## **B. Imunohistokimia sebagai Pendekatan Modern dalam Diagnosis**

Penggunaan antibodi spesifik untuk identifikasi antigen jaringan adalah teknik imunohistokimia yang digunakan untuk:

1. Mendeteksi antigen spesifik: Antibodi spesifik digunakan untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan.
2. Mengidentifikasi jenis sel: Antibodi spesifik dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis sel tertentu dalam jaringan.
3. Diagnostik penyakit: Imunohistokimia digunakan dalam diagnosis penyakit, seperti kanker, dengan mendeteksi antigen spesifik yang terkait dengan penyakit tersebut.

Penggunaan antibodi spesifik memiliki beberapa keuntungan, seperti:

1. Spesifisitas tinggi: Antibodi spesifik dapat mendeteksi antigen spesifik dengan spesifisitas tinggi.
2. Sensitivitas tinggi: Imunohistokimia dapat mendeteksi antigen dalam jumlah kecil.
3. Informasi diagnostik: Imunohistokimia dapat memberikan informasi diagnostik yang penting dalam pengelolaan pasien.

Dengan demikian, penggunaan antibodi spesifik untuk identifikasi antigen jaringan merupakan teknik yang berguna dalam patologi dan penelitian biomedis.

Imunohistokimia memainkan peran penting dalam menentukan asal-usul sel tumor dengan menggunakan antibodi spesifik untuk mendeteksi antigen tertentu dalam jaringan tumor. Teknik ini membantu dalam :

1. Mengidentifikasi jenis sel tumor: Imunohistokimia dapat membantu mengidentifikasi jenis sel tumor berdasarkan ekspresi antigen spesifik.
2. Menentukan asal-usul tumor: Dengan mendeteksi antigen spesifik, imunohistokimia dapat membantu menentukan asal tumor dan membedakannya dari tumor lain.
3. Mendiagnosis penyakit: Imunohistokimia digunakan dalam diagnosis penyakit, termasuk kanker, dengan mendeteksi antigen spesifik yang terkait dengan penyakit tersebut.
4. Menentukan prognosis: Ekspresi reseptor hormon steroid pada sel tumor dapat menentukan prognosis penyakit, seperti pada kanker payudara tipe luminal A yang memiliki prognosis lebih baik dibandingkan dengan tipe triple negatif.

Dalam praktek klinis, imunohistokimia digunakan untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan tumor, membantu dalam diagnosis dan penentuan asal-usul tumor, serta mengembangkan rencana pengobatan. Dengan mengetahui asal-usul tumor, dokter dapat mengembangkan rencana pengobatan yang lebih efektif.

### C. Perbandingan Histokimia dan Imunohistokimia dalam Histopatologi

Kelebihan Histokimia dan Imunohistokimia dalam histopatologi adalah sebagai berikut :

1. Spesifisitas tinggi  
Histokimia dan imunohistokimia dapat mendeteksi molekul spesifik dalam jaringan.
2. Sensitivitas tinggi  
Teknik ini dapat mendeteksi molekul dalam jumlah kecil.
3. Informasi diagnostik  
Histokimia dan imunohistokimia dapat memberikan informasi diagnostik yang penting dalam pengelolaan pasien.
4. Membantu diagnosis  
Teknik ini dapat membantu diagnosis penyakit, termasuk kanker.

Adapun keterbatasan Histokimia dan Imunohistokimia dalam histopatologi adalah sebagai berikut :

1. Imunohistokimia memerlukan antibodi spesifik yang berkualitas tinggi.
2. Hasil histokimia dan imunohistokimia dapat dipengaruhi oleh teknik yang digunakan.
3. Interpretasi hasil histokimia dan imunohistokimia memerlukan keahlian dan pengalaman.
4. Teknik ini dapat memerlukan biaya yang relatif tinggi.

Keterbatasan lainnya yaitu kualitas sampel jaringan dapat mempengaruhi hasil histokimia dan imunohistokimia. Serta proses histokimia dan imunohistokimia dapat memerlukan waktu yang lama. Dengan memahami kelebihan dan keterbatasan histokimia dan imunohistokimia, tenaga medis/dokter dan peneliti dapat menggunakan teknik ini secara efektif dalam diagnosis dan penelitian penyakit.

Adapun perbandingan antara histokimia dan imunohistokimia:

Histokimia untuk mendeteksi molekul kimia dalam jaringan. Contohnya pada penggunaan pewarnaan PAS (*Periodic Acid-Schiff*) untuk mendeteksi glikogen. Serta digunakan untuk

diagnosis penyakit yang terkait dengan perubahan kimia dalam jaringan.

Imunohistokimia untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan menggunakan antibodi. Contoh pada HER2 (*Human Epidermal Growth 2*) untuk mendeteksi kanker payudara. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) adalah protein yang dapat ditemukan pada permukaan sel kanker payudara. Tes HER2 digunakan untuk mendeteksi apakah kanker payudara memiliki ekspresi HER2 yang berlebihan.

Selain itu imunohistokimia digunakan juga untuk diagnosis penyakit yang terkait dengan ekspresi protein spesifik.

Meningkatkan Akurasi Diagnosis juga merupakan peran Histokimia dan Imunohistokimia, seperti :

1. Menggunakan histokimia dan imunohistokimia bersama-sama dapat meningkatkan akurasi diagnosis.
2. Imunohistokimia dapat memberikan spesifitas tinggi dalam mendeteksi antigen spesifik.
3. Histokimia dan imunohistokimia dapat memberikan informasi tambahan tentang struktur dan fungsi jaringan.

Dengan menggunakan histokimia dan imunohistokimia secara efektif, dokter dapat meningkatkan akurasi diagnosis dan memberikan pengobatan yang lebih tepat untuk pasien.

#### **D. Histokimia dan Imunohistokimia pada Kasus Spesifik**

- 1. Peran ER, PR, dan HER2 dalam Diagnosis Kanker Payudara**
  - a. ER (Estrogen Receptor): ER adalah reseptor hormon estrogen yang dapat ditemukan pada permukaan sel kanker payudara. Kanker payudara ER-positif dapat diobati dengan terapi hormon.
  - b. PR (Progesterone Receptor): PR adalah reseptor hormon progesteron yang dapat ditemukan pada permukaan sel kanker payudara. Kanker payudara PR-positif dapat diobati dengan terapi hormon.

- c. HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2): HER2 adalah protein yang dapat ditemukan pada permukaan sel kanker payudara. Kanker payudara HER2-positif dapat diobati dengan terapi target HER2.

Manfaat Tes ER, PR, dan HER2 antara lain sebagai :

- a. Menentukan pengobatan yang tepat untuk pasien kanker payudara.
- b. Meningkatkan prognosis pengobatan yang tepat berdasarkan hasil tes ER, PR, dan HER2
- c. Pengobatan yang tepat dapat mengurangi risiko kekambuhan kanker payudara.

Dengan demikian, tes ER, PR, dan HER2 merupakan pemeriksaan penting dalam diagnosis dan pengobatan kanker payudara.

## **2. Penerapan pada penyakit hati (fibrosis, hepatitis)**

Penerapan histokimia dan imunohistokimia pada penyakit hati seperti fibrosis dan hepatitis sangat penting untuk diagnosis yang akurat dan pengobatan yang efektif.

Histokimia dalam Diagnosis Penyakit Hati dapat diterapkan pada beberapa pemeriksaan, diantaranya adalah:

- a. Pewarnaan khusus: Digunakan untuk mendeteksi perubahan struktur jaringan hati, seperti fibrosis dan peradangan.
- b. Pewarnaan Masson's Trichrome: Mewarnai serat kolagen berwarna biru, membantu mendeteksi fibrosis hati.
- c. Pewarnaan PAS (Periodic Acid-Schiff): Memeriksa struktur yang mengandung molekul karbohidrat dalam jumlah tinggi, membantu mendeteksi perubahan pada jaringan hati.

Imunohistokimia dalam Diagnosis Penyakit Hati digunakan untuk mendeteksi antigen spesifik pada jaringan hati, membantu diagnosis penyakit hati seperti hepatitis dan fibrosis. Selain itu juga digunakan untuk menentukan prognosis penyakit hati dengan mendeteksi biomarker

spesifik. Mengidentifikasi jenis sel yang terkait dengan penyakit hati, membantu diagnosis yang lebih akurat.

Penerapan dalam Penyakit Hati :

- a. Hepatitis: Imunohistokimia dapat membantu mendeteksi virus hepatitis dan menentukan jenis hepatitis.
- b. Fibrosis hati: Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu mendeteksi perubahan struktur jaringan hati dan menentukan tingkat keparahan fibrosis <sup>1 2</sup>.

Dengan demikian, histokimia dan imunohistokimia merupakan alat penting dalam diagnosis dan pengobatan penyakit hati seperti fibrosis dan hepatitis.

### **3. Penerapan pada Identifikasi infeksi melalui teknik pewarnaan khusus.**

Teknik pewarnaan khusus dapat digunakan untuk mengidentifikasi infeksi bakteri dan jamur dalam sampel jaringan.

Pewarnaan untuk Bakteri:

- a. Gram: Pewarnaan Gram digunakan untuk mengidentifikasi bakteri Gram-positif dan Gram-negatif.
- b. Ziehl-Neelsen: Pewarnaan Ziehl-Neelsen digunakan untuk mengidentifikasi bakteri asam-alkohol tahan, seperti *Mycobacterium tuberculosis*.

Pewarnaan untuk Jamur:

- a. PAS (Periodic Acid-Schiff): Pewarnaan PAS digunakan untuk mengidentifikasi jamur yang memiliki dinding sel yang kaya akan karbohidrat, seperti *Candida*.
- b. Gomori Methenamine Silver (GMS): Pewarnaan GMS digunakan untuk mengidentifikasi jamur, seperti *Aspergillus* dan *Histoplasma*.

Manfaat Pewarnaan Khusus:

- a. Pewarnaan khusus dapat membantu mengidentifikasi patogen yang menyebabkan infeksi.
- b. Pewarnaan khusus dapat membantu diagnosis yang akurat dan pengobatan yang efektif.

- c. Pewarnaan khusus dapat membantu menentukan pengobatan yang tepat untuk infeksi bakteri dan jamur.

#### **E. Implikasi Klinis dan Prospek Masa Depan**

Peran Histokimia dan Imunohistokimia dalam dalam prospek masa depan digunakan menentukan prognosis pasien, diantaranya adalah :

1. Sebagai diagnosis untuk mendeteksi biomarker, histokimia dan imunohistokimia dapat mendeteksi biomarker spesifik yang terkait dengan prognosis penyakit.
2. Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu menentukan tingkat keparahan penyakit, seperti kanker.
3. Mengidentifikasi jenis sel: Imunohistokimia dapat mengidentifikasi jenis sel yang terkait dengan penyakit, membantu menentukan prognosis.
4. Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu menentukan respons pengobatan dan memantau efektivitas terapi.

Contoh Peran Histokimia dan Imunohistokimia diantaranya adalah :

1. Kanker payudara: Imunohistokimia dapat mendeteksi HER2, ER, dan PR, membantu menentukan prognosis dan pengobatan.
2. Kanker lainnya: Histokimia dan imunohistokimia dapat mendeteksi biomarker spesifik, membantu menentukan prognosis dan pengobatan.

Dengan demikian, histokimia dan imunohistokimia merupakan alat penting dalam menentukan prognosis pasien dan memantau efektivitas pengobatan.

Pemanfaatan Histokimia dan Imunohistokimia dalam Terapi Bertarget diantaranya adalah :

1. Identifikasi target molekuler: Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu mengidentifikasi target molekuler spesifik yang terkait dengan penyakit.

2. Menentukan respons pengobatan: Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu menentukan respons pengobatan dan memantau efektivitas terapi bertarget.
3. Mengidentifikasi biomarker: Histokimia dan imunohistokimia dapat mengidentifikasi biomarker spesifik yang terkait dengan respons pengobatan.
4. Personalisasi pengobatan: Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu personalisasi pengobatan dengan menentukan target molekuler spesifik yang terkait dengan penyakit pasien.

Contoh Pemanfaatan Histokimia dan Imunohistokimia:

1. Kanker payudara: Imunohistokimia dapat mendeteksi HER2, membantu menentukan pengobatan bertarget dengan trastuzumab.
2. Kanker lainnya: Histokimia dan imunohistokimia dapat membantu mengidentifikasi target molekuler spesifik, membantu menentukan pengobatan bertarget yang efektif.

Dengan demikian, histokimia dan imunohistokimia merupakan alat penting dalam terapi bertarget, membantu meningkatkan efektivitas pengobatan dan mengurangi efek sampingan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aditya Digambiro Reza & Parwanto Edy, (2024), Panduan prosesi dan pewarnaan jaringan dalam histopatologi
- Dudás, B. (2023). Human histology: A text and atlas for physicians and scientists. Academic Press
- Hoda SA, Hoda RS. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, American Journal of Clinical Pathology, 2020, 154(6): 869,
- J.A. Kiernan. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. 5th edition, Scion Publishing, 2015, 571 pp
- Lester SC. Manual of Surgical Pathology. 4th Edition - June 24, 2022, Elsevier: 640 halaman.
- Purslow, P. P. (2020). The structure and role of intramuscular connective tissue in muscle function. *Frontiers in Physiology*, 11, 495.
- Raven, J. P. H., Raven, P., & Chew, S. L. (2022). The Endocrine System: The Endocrine System, E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Sikkeland J, Jin Y, Saatcioglu F. Methods to assess lipid accumulation in cancer cells. In *Methods in Enzymology*. 2014, 542: 407-423.
- Sitohistoteknologi Advance, Wimpy & Maliza R et al, (2024) Eureka Media Aksara
- Streckfus, C. F. (2022). Exocrinology: A Textbook and Atlas of the Exocrine Cells, Glands and Organs. Springer Nature.
- Tam, C. S., Lecoultre, V., & Ravussin, E. (2012). Brown adipose tissue: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Circulation*, 125(22), 2782-2791.

# BAB 3

## PRINSIP DASAR HISTOKIMIA

Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med.

### A. Pengertian Histokimia

Kata histokimia berasal dari bahasa Yunani "*historia*" (yang berarti jaringan) dan kimia (Histochemical, 2018). Histokimia adalah cabang ilmu yang mempelajari distribusi dan sifat-sifat kimia dari komponen dalam jaringan biologis. Dalam konteks ini, histokimia menggunakan teknik pewarnaan dan analisis mikroskopis untuk mengidentifikasi senyawa kimia yang terdapat dalam sel atau jaringan. Histokimia sangat penting dalam memahami struktur dan fungsi jaringan, serta dalam mengidentifikasi komponen spesifik yang berperan dalam berbagai proses biologis (Studyx, 2025). Histokimia melibatkan pewarnaan diferensial sel dan elemen jaringan lainnya berdasarkan perbedaan kimia di antara bagian-bagiannya. Sebagian besar jaringan bersifat transparan, sehingga untuk melihatnya di bawah mikroskop cahaya, kita perlu mewarnainya (Histochemical, 2018).

Histokimia adalah teknik pewarnaan penting yang digunakan untuk visualisasi struktur biologis. Ini digunakan dalam identifikasi dan pemetaan distribusi komponen kimia dari jaringan. Komponen kimia dari jaringan dikenal melalui identifikasi struktur sel, termasuk aktivitas enzimatik sel. Pewarnaan histokimia modern yang digunakan adalah Periodic Acid Schiff (PAS), toluidine blue, dan giemsa (Ardiyana, 2020). Ada banyak teknik histokimia, masing-masing sesuai untuk

tujuan tertentu. Berbagai zat kimia bereaksi dengan beberapa komponen jaringan, membentuk struktur kecil berwarna atau berpendar yang dapat diamati di bawah mikroskop. Contoh histokimia meliputi penggunaan pewarna tertentu untuk mewarnai struktur tertentu, antibodi untuk mendeteksi protein, lektin untuk mendeteksi karbohidrat, atau asam nukleat sintetis untuk mendeteksi dna atau rna. Teknik yang lebih kompleks dapat memberi kita informasi yang lebih lengkap, seperti bagaimana molekul berinteraksi satu sama lain, atau seberapa cepat mereka bergerak di dalam kompartemen subseluler tertentu. Teknik-teknik ini memberi kita informasi penting tentang struktur jaringan dan seluler, proses biokimia, dan komponen molekuler dari setiap sampel biologis. Melalui histokimia, kita dapat mengidentifikasi perubahan jaringan selama perkembangan dan penyakit, serta membantu menemukan penanda penyakit baru (Histochemical, 2018).

## **B. Manfaat Pewarnaan Histokimia**

Histokimia adalah teknik yang digunakan dalam biologi dan kedokteran untuk mempelajari lokasi dan distribusi zat kimia dalam jaringan biologis. Teknik ini penting untuk memahami fisiologi dan patologi jaringan, memungkinkan identifikasi molekul spesifik, seperti protein, lipid, dan karbohidrat, pada tingkat seluler dan subseluler. Proses histokimia meliputi fiksasi jaringan, pemrosesan untuk penanaman parafin, pemotongan menjadi slide tipis, pewarnaan dengan reagen spesifik, dan pengamatan mikroskopis. Kombinasi berbagai pewarna memungkinkan visualisasi dan diferensiasi berbagai struktur dan molekul, memberikan informasi berharga untuk penelitian ilmiah dan diagnosis klinis (Y7rik, 2024).

Histokimia telah memberikan kontribusi penting selama berabad-abad, seperti demonstrasi Paul Ehrlich tentang keberadaan sawar darah-otak. Hal ini dimungkinkan karena otak hewan percobaan yang digunakan Ehrlich tidak diwarnai dengan anilin, suatu zat pewarna basa.

### C. Reaksi Pewarnaan Spesifik

Histokimia didasarkan pada pewarnaan struktur seluler atau molekul yang terdapat dalam jaringan, berkat afinitasnya terhadap pewarna tertentu. Reaksi pewarnaan struktur atau molekul ini dalam bentuk aslinya kemudian divisualisasikan di bawah mikroskop optik atau mikroskop elektron. Spesifisitas pewarnaan disebabkan oleh adanya gugus penerima ion yang terdapat pada sel atau molekul jaringan. Pada akhirnya, tujuan reaksi histokimia adalah untuk mengungkap, melalui warna, segala sesuatu mulai dari struktur biologis terbesar hingga jaringan dan sel terkecil. Hal ini dapat dicapai karena pewarna bereaksi secara kimiawi dengan molekul jaringan, sel, atau organel (Y7rik, 2024).

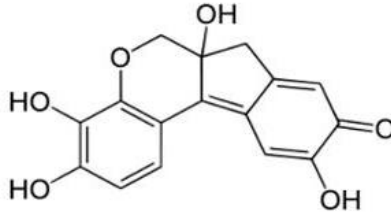
### D. Jenis-Jenis Pewarnaan Histokimia

Jenis pewarnaan histokimia meliputi pewarnaan rutin seperti Hematoxylin Eosin (H&E) yang mewarnai inti sel dan sitoplasma, serta pewarnaan khusus untuk mendeteksi senyawa spesifik seperti Periodic Acid Schiff (PAS) untuk karbohidrat, Alcian Blue untuk asam mukopolisakarida.

#### 1. Pewarnaan Rutin

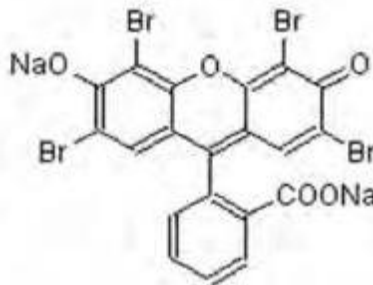
##### a. Pewarnaan Hematoxylin Eosin (H&E)

Hematoxylin berasal dari bahasa Yunani *haimatodec* (darah) dan *xylon* (kayu). Pewarna ini mengikat inti sel secara lemah kecuali jika dikombinasikan dengan logam seperti aluminium, besi, krom, atau tembaga. Bentuk aktif yang digunakan adalah hematin, hasil oksidasi hematoxylin. Proses oksidasi ini disebut ripening dan dapat dipercepat dengan oksidator seperti merkuri oksida, hidrogen peroksida, kalium permanganat, atau natrium iodate. Hematin mengikat molekul bermuatan negatif, seperti kromatin dalam inti sel yang bersifat asam, sehingga hematin (bersifat basa) akan berikatan dengan kromatin (Gill, 2010).



**Gambar 3.1** Struktur Kimia Hematoksilin  
(Khristian, 2017).

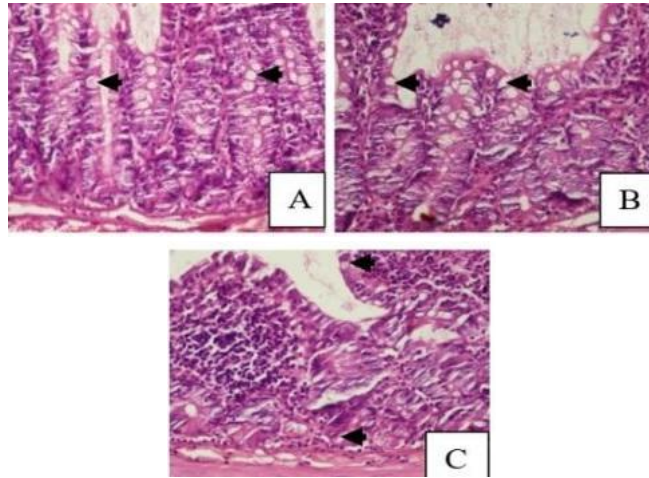
Eosin adalah pewarna sintetis dari golongan xanthene yang bersifat asam dan mengikat protein bermuatan positif di sitoplasma dan jaringan ikat. Sebagai counterstain, eosin mewarnai sitoplasma dan jaringan ikat dalam nuansa merah-oranye serta mengubah warna inti sel yang telah terwarnai hematoxylin dari biru menjadi ungu. Jenis eosin komersial meliputi Eosin Y (kekuningan, larut air), Etil Eosin (larut alkohol), dan Eosin B (kebiruan). Eosin Y adalah yang paling umum digunakan bersama hematoxylin (Khristian, 2017).



**Gambar 3.2** Eosin Y (tetrabromo fluorescein)  
(Gill, 2010).

Hematoxylin Eosin adalah metode rutin untuk menunjukkan struktur jaringan (Kawilarang, 2022). Pewarnaan HE terdiri dari dua macam zat warna, yaitu hematoxylin yang berfungsi untuk memberikan warna biru (basofilik) pada inti sel dan eosin yang berfungsi untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma

sel. Hematoxylin bersifat basa sedangkan inti sel bersifat asam, keduanya menimbulkan suatu ikatan lemah sehingga inti sel dapat berwarna (Putri and Sofyanita, 2023). Pewarnaan ini menghasilkan warna Inti sel biru, otot merah muda terang, dan jaringan ikat merah muda pucat (Kawilarang, 2022).



**Gambar 3.3** Struktur Morfologi Sel Goblet Pewarnaan HE (Atas, A: Normal, B: Akut dan C: Kronis) perbesaran 40x (Chairani et al., 2022).

Teknik pewarnaan HE struktur sel goblet terlihat mempunyai sitoplasma yang jernih, pada pewarnaan HE jaringan usus besar akan berwarna merah muda dan inti sel berwarna ungu, sedangkan sitoplasma sel goblet yang mengandung musin atau glikoprotein tidak terwarnai sehingga sitoplasma terlihat jernih (Chairani et al., 2022).

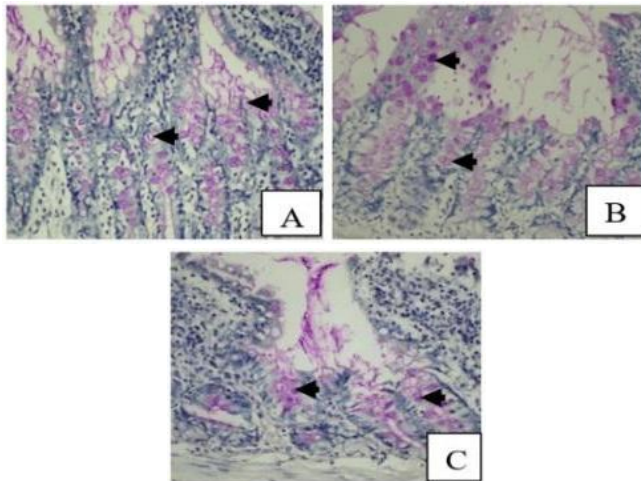
## 2. Pewarnaan Khusus

### a. Pewarnaan Periodic Acid Schiff (PAS)

Teknik periodic acid schiff's (PAS) merupakan bagian dari teknik pewarnaan histokimia yang khusus dapat mendeteksi adanya glikogen dan glikokonjugat tertentu yang berada di jaringan (Suvarna et al., 2019).

Prinsip kerja Teknik Pewarnaan PAS adalah adanya reaktivitas dari aldehid bebas di dalam karbohidrat dengan reagen Schiff's untuk membentuk produk magenta. Penggunaan Teknik PAS dalam diagnosis patologi adalah untuk menyingkirkan diagnosis banding berbagai tumor yang mengandung glikogen dan musin (Yona et al., 2022).

Teknik histokimia PAS bermanfaat pada diagnosis banding tumor yang berdiferensiasi buruk dengan asal yang tidak diketahui, dalam hal ini deteksi musin merupakan kunci utama untuk identifikasi (Suvarna et al., 2019). Histokimia musin dapat menentukan profil musin dari adenokarsinoma kolorektal yang berguna sebagai indikator prognostik dan diagnosis dini yang dapat membantu mengurangi kematian (Nikumbh et al., 2012).



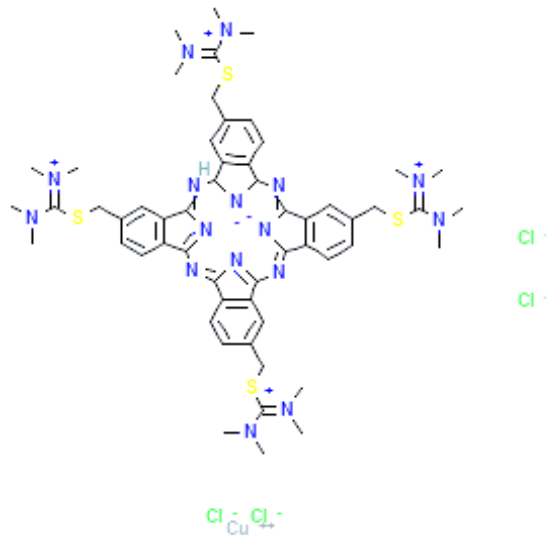
**Gambar 3.4** Struktur Morfologi Sel Goblet Pewarnaan PAS (Bawah, A: Normal, B: Akut dan C: Kronis) Perbesaran 40x (Chairani et al., 2022).

Pada jaringan dengan pewarnaan PAS sitoplasma sel goblet diamati berwarna merah magenta. Pewarnaan PAS sitoplasma sel goblet berwarna merah magenta karena pewarnaan ini mampu mewarnai musin atau

glikoprotein pada sitoplasma tersebut (Chairani et al., 2022).

### b. Pewarnaan Alcian Blue

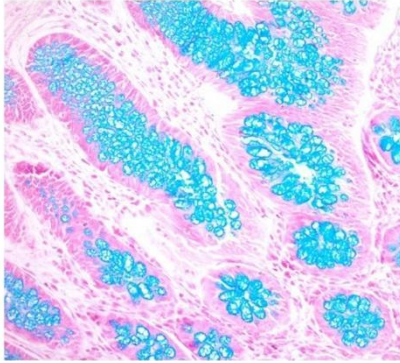
Alcian blue merupakan pewarna golongan phthalosianin tembaga yang digunakan dalam pewarnaan asam mukopolisakarida dan proteoglikan jaringan ikat. Alcian blue mengandung empat gugus tetrametilisothiuronium yang bermuatan positif (tetra kationik) yang berikatan secara elektrostatis dengan muatan negative dari glikoaminoglikan (heparin) (Nugroho and Maeyama, 2011).



**Gambar 3.5** Struktur kimia alcian blue (Pubchem, 2025).

Distribusi karbohidrat dalam suatu organ dapat diketahui dengan pewarnaan histokimia Alcian Blue (AB) yang digunakan untuk mendeteksi karbohidrat asam (Ranus et al., 2024). Pewarnaan Alcian blue biasanya digunakan untuk pewarnaan tulang dan tulang rawan. Pengikatan Alizarin merah S dan kalsium paling stabil pada kondisi basa, namun, Alcian biru menunjukkan

ikatan spesifik dengan zat polianionik seperti mukopolisakarida dalam kondisi asam. Protokol pewarnaan tulang dan tulang rawan yang umum dilakukan dalam kondisi asam (Zinck and Franz-Odendaal, 2020).



**Gambar 3.6** Pewarnaan Alcian Blue Solution (pH 2.5) pada kolon manusia normal. Pembesaran 200X (Diagnostic Biosystems, 2025).

## DAFTAR PUSTAKA

- Ardiyan, Y.N., 2020. A Review of Quality Control In Histochemistry and Immunohistochemistry Staining. Berk. Ilm. Kedokt. Duta Wacana 5, 74–79. <https://doi.org/10.21460/bikdw.v5i2.180>
- Chairani, Wahyuni, F., Tofrizal, Salsabila, 2022. Struktur Histologi dan Jumlah Sel Goblet Pada Sediaan Histopatologis Radang Usus Besar dengan Pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE) dan Periodic Acid Schiff (PAS). Ensiklopedia J. 4.
- Diagnostic, B., 2025. Alcian Blue (pH 2.5) Stain Kit.
- Gill, G.W., 2010. H&E Staining : Oversight and Insights.
- Histochemical, S., 2018. What Is Histochemistry [WWW Document]. Histochem. Soc. URL <https://shorturl.at/j4ezn> (accessed 9.17.25).
- Kawilarang, A.P., 2022. Perbandingan Pewarnaan Haematoxylin & Eosin(HE) dan Gomori Methenamine Silver –Haematoxylin Eosin(GMS-HE) pada beberapa Jamur Sistemik didalam Jaringan. J. Mikol. Klin. Penyakit Menular(JMKPM) 1, 6–11.
- Khristian, E., 2017. Sitohistoteknologi Bab IX Pewarnaan, in: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. pp. 208–226.
- Nikumbh, R.D., Nikumbh, D.B., Umarji, B.N., 2012. Mucin Histochemical Study of the Colon in Normal and Malignant Lesions. Int. J. Heal. Sci. Res. 2, 20–32.
- Nugroho, A.E., Maeyama, K., 2011. Evaluasi Pewarnaan Alcian Blue Terhadap Sel Mast Jaringan Ikat Dari Preparat Beku Jaringan Kulit Kaki Tikus. Pharmacy 8, 10–20.
- Pellicciari, C., 2018. Histochemistry as a Versatile Research Toolkit in Biological Research, Not Only an Applied Discipline in Pathology. Eur. J. Histochem. 62. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.3006>

- Pubchem, 2025. Alcian Blue [WWW Document]. Natl. Libr. Med. URL  
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Alcian-blue>  
 (accessed 9.19.25).
- Putri, R.D., Sofyanita, E.N., 2023. Perbedaan Hasil Pewarnaan Hematoxylin Eosin (He) Pada Histologi Kolon Mencit (Mus Musculus) Berdasarkan Ketebalan Pemotongan Mikortom 3, 6 dan 9  $\mu\text{m}$ . *J. Labora Med.* 7, 31–38.
- Ranus, T.Y.W., Amalo, F.A., Maha, I.T., Nitbani, H., Selan, Y.N., 2024. Distribusi Karbohidrat Asam dan Netral pada Epididimis Sapi Sumba Ongole (*Bos indicus*). *Bioma Berk. Ilm. Biol.* 26, 35–42.  
<https://doi.org/10.14710/bioma.2024.61592>
- StudyX, 2025. Pengertian Histokimia [WWW Document]. StudyX.
- Suvarna, K.S., Layton, C., Bancroft, J.D., 2019. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book, 8th ed. Elsever.
- Y7rik, 2024. Histokimia : Dasar, Pengolahan, Pewarnaan [WWW Document]. Maest. Virtuale. URL  
<https://maestrovirtuale.com/id/pengolahan-dasar-histokimia-pewarnaan/> (accessed 9.18.25).
- Yona, F., Agus, S., Tofrizal, 2022. Aplikasi Teknik Periodic Acid Schiff (PAS) Dalam Diagnosis Histopatologi Keganasan, Infeksi Jamur dan Kelainan Imunologi. *Collab. Med. J.* 5, 16–25.
- Zinck, N., Franz-Odendaal, T.A., 2020. Accurate Whole-Mount Bone and Cartilage Staining Requires Acid-Free Conditions. *Anat. Rec.* <https://doi.org/10.1002/ar.24526>

# BAB

# 4

# PEWARNAAN HISTOKIMIA

Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed.

## A. Pendahuluan

Pewarnaan histokimia merupakan teknik khusus dalam histologi yang bertujuan untuk mengidentifikasi dan memvisualisasikan komponen kimia tertentu pada jaringan secara *in situ*, tanpa perlu mengekstraksi atau mengisolasi zat tersebut dari sel. Secara prinsip, pewarnaan histokimia menggunakan reaksi kimia selektif antara pereaksi pewarna dengan gugus kimia pada jaringan. Interaksi ini menghasilkan produk reaksi berwarna yang dapat diamati melalui mikroskop cahaya maupun fluoresen. Reaksi tersebut bersifat spesifik pada molekul target, sehingga memberikan keunggulan dibandingkan pewarna nonspesifik yang cenderung hanya menonjolkan perbedaan kontras antar struktur (Bancroft & Gamble, 2019).

Secara umum Teknik pewarnaan histokimia mencakup prinsip dasar proses pewarnaan histologi. Adapun langkah-langkahnya:

1. Pemilihan pewarna: pewarna yang digunakan harus mampu menunjukkan perbedaan antara berbagai struktur komponen sel dan jaringan. Misalnya pewarnaan hematoksilin bersifat basa untuk mewarnai inti sel sedangkan inti sel yang kaya akan asam nukleat menggunakan eosin pewarna asam.

2. Persiapan sampel jaringan yang biasanya di deparafinisasi dan didehidrasi untuk menghilangkan parafin dan mengembalikan sampel ke keadaan alami sebelum proses pewarnaan.
3. Aplikasi pewarna diterapkan pada sampel dengan cara merendam preparat dalam larutan pewarna atau dengan meneteskan pewarna langsung ke preparat.
4. Diferensiasi dan pencucian dilakukan untuk menghilangkan kelebihan pewarna dan memperjelas Gambaran histologi.
5. Dehidrasi dan *mounting* dilakukan dengan serangkaian alkohol dan xilol untuk mempersiapkan *mounting*. Setelah itu kaca penutup ditempelkan dengan media *mounting* dan preparate dibiarkan mengering sebelum dianalisis dibawah mikroskop.

Dengan demikian, pewarnaan histokimia berperan sebagai jembatan antara morfologi mikroskopis dan komposisi biokimia jaringan. Pendekatan ini memberikan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai hubungan antara struktur seluler, fungsi fisiologis, dan perubahan patologis yang terjadi pada berbagai kondisi.

## **B. Klasifikasi Teknik Pewarnaan Histokimia**

Teknik Pewarnaan histokimia dapat diklasifikasikan berdasarkan jenis molekul atau komponen jaringan yang ingin di deteksi. Secara umum klasifikasi utama pewarnaan histokimia mencakup berbagai pewarnaan antara lain (Kiernan, 2008; Bancroft & Gamble, 2019):

1. Pewarnaan untuk karbohidrat melalui reaksi oksidasi atau interaksi dengan zat warna basa. Molekul yang dideteksi dapat berupa glikogen, glikoprotein dan mukopolisakarida netral (Suvarna et al., 2018). Selain itu dapat mengidentifikasi mukopolisakarida asam, seperti asam hialuronat dan sulfat glikosaminoglikan (Pearse, 1985).
2. Pewarnaan protein dan Enzim yang dapat digambarkan melalui pewarnaan non spesifik maupun reaksi kimia dengan gugus tertentu. Gugus asam amino bebas akan

memberikan warna tertentu dalam pewarnaan. Enzim dalam jaringan juga dapat dipelajari melalui histokimia enzim dengan penggunaan substrat kromogen yang menghasilkan endapan berwarna di lokasi aktivitas enzim (Rossi & Parra, 2018).

3. Pewarnaan Lipid dilakukan menggunakan pelarut organik sehingga jaringan tidak dapat diawetkan dengan teknik parafin biasa. Oleh karena itu, pewarnaan lipid dilakukan pada potongan beku. Molekul yang terdeteksi antara lain trigliserida, lemak netral, fosfolipid, steroid, dan lemak kompleks. Selain itu pewarnaan lipid dapat membedakan lipid netral dari lipid polar (Bancroft & Gamble, 2019).
4. Pewarnaan Asam Nukleat baik DNA maupun RNA, memiliki reaktivitas kimia yang memungkinkan visualisasi spesifik. Teknik yang dilakukan dapat membedakan antar DNA dan RNA (Kiernan, 2008; Suvarna et al., 2018).
5. Pewarnaan Pigmen dan Mineral dapat dilakukan dengan molekul yang di deteksi antara lain melanin dan lipofuscin untuk pigmen dan ion ferri (Fe), kalsium melalui pengendapan perak serta tembaga. (Pearse, 1985; Rossi & Parra, 2018).

Dengan klasifikasi ini, teknik pewarnaan histokimia dapat dipilih sesuai target molekul yang ingin diamati. Pendekatan yang sistematis memungkinkan peneliti maupun praktisi medis memperoleh gambaran biokimia jaringan yang lebih spesifik dibandingkan pewarnaan histologi konvensional.

### **C. Pewarnaan Karbohidrat**

Teknik pewarnaan histokimia untuk karbohidrat umumnya didasarkan pada kemampuan gugus hidroksil dan glikol karbohidrat untuk mengalami oksidasi atau berikatan dengan zat warna kationik tertentu. Molekul yang dapat diidentifikasi antara lain glikogen, mukopolisakarida, glikoprotein, serta proteoglikan. Identifikasi karbohidrat dalam histologi sangat penting karena distribusinya berhubungan erat dengan fungsi seluler dan dapat menunjukkan perubahan pada

kondisi patologis, misalnya akumulasi mukopolisakarida pada penyakit penyimpanan lisosomal atau peningkatan glikogen pada hepatosit pada kondisi diabetes melitus (Kiernan, 2008).

Beberapa metode utama yang digunakan antara lain:

### 1. Asam Periodat-Schiff

Metode Asam Periodat-Schiff merupakan salah satu teknik paling klasik dan banyak digunakan untuk mendeteksi karbohidrat jaringan. Prinsipnya adalah oksidasi gugus glikol oleh asam periodat menghasilkan gugus aldehyd, yang kemudian bereaksi dengan pereaksi Schiff membentuk warna merah-ungu atau magenta (Bancroft & Gamble, 2019).

#### a. Tahapan Pewarnaan

- 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades.
- 2) Oksidasi dengan asam periodat: Inkubasi dengan 0,5-1% asam periodat selama 5-10 menit terjadinya oksidasi glikol membentuk aldehyd bebas. Cuci dengan air suling untuk menghilangkan sisa asam periodat.
- 3) Pewarnaan dengan pereaksi schiff: Inkubasi dalam pereaksi Schiff selama 10-20 menit. Cuci dalam air mengalir dilakukan 10-15 menit sampai warna magenta stabil.
- 4) Pewarnaan hematoksilin (opsional) untuk kontras inti biasanya dengan inkubasi selama 1-2 menit.
- 5) Dehidrasi dilakukan dengan alkohol bertingkat, penyamarataan dengan xilol dan *mounting* dengan resin.

b. Hasil pewarnaan: struktur positif tampak berwarna magenta terang, inti sel biru dan sitoplasma lain pucat atau tidak berwarna.

### 2. Biru Alcian

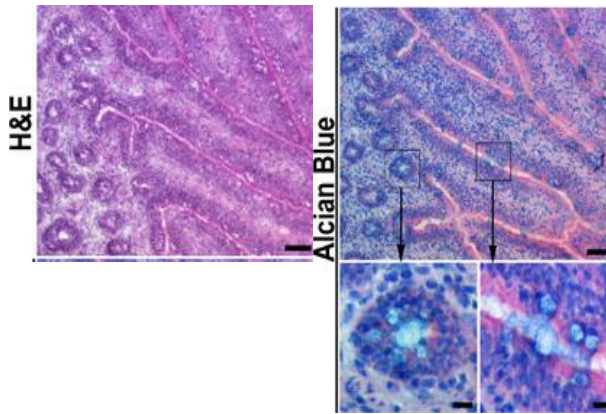
Biru Alcian merupakan pewarna kationik yang berikatan dengan gugus karboksil dan sulfat pada mukopolisakarida asam. Reaksi ini spesifik untuk

mendeteksi mukus asam, termasuk glikosaminoglikan sulfat dan non-sulfat (Pearse, 1985).

a. Tahapan pewarnaan Biru Alcian

- 1) Deparafinisasi dalam xilol, lalu rehidrasi ke air suling.
- 2) Pewarnaan dengan biru alcian Inkubasi dalam larutan biru alcian 1% (pH 2,5, dilarutkan dalam asam asetat 3%) selama  $\pm$  30 menit. Mukopolisakarida asam akan berikatan dengan pewarna membentuk warna biru. Cuci dengan air suling
- 3) *Counterstain* (opsional) menggunakan *Nuclear Fast Red* selama 5 menit membuat inti sel tampak merah
- 4) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat, pemerataan dengan xilol dan *mounting* dengan resin.

b. Hasil pewarnaan: Mukopolisakarida asam positif tampak berwarna biru, inti sel berwarna merah, dan sitoplasma pucat tidak berwarna.



**Gambar 4.1** Pewarnaan Khas Asam Periodat-Schiff dan Biru Alcian

(Cohen, M., Varki, N., Jankowski, M., Gagneux, P, 2012)

#### D. Pewarnaan Protein dan Enzim

Protein merupakan makromolekul esensial yang berperan dalam struktur maupun fungsi sel. Dalam histologi, identifikasi distribusi protein penting dilakukan untuk memahami komposisi jaringan, aktivitas metabolik, serta perubahan

patologis yang mungkin terjadi. Pewarnaan histokimia untuk protein dapat dilakukan secara nonspesifik (mewarnai protein total) maupun spesifik (mendeteksi gugus tertentu atau aktivitas enzim) (Kiernan, 2008).

### 1. Bromofenol biru

Larutan bromofenol biru merupakan pewarna asam yang digunakan untuk mendeteksi protein total dalam jaringan. Mekanisme pewarnaan terjadi melalui ikatan elektrostatis antara pewarna bermuatan negatif dengan gugus amina pada protein.

#### a. Tahapan Pewarnaan bromofenol biru

- 1) Deparafinisasi dalam xilol, lalu rehidrasi ke air suling.
- 2) Pewarnaan bromofenol biru dengan inkubasi dalam larutan bromofenol biru 0,1-05% dengan *buffer* asetat (pH 4,6) selama 20-30 menit. Larutan bromofenol biru berikatan dengan protein terutama gugus amino. Cuci dengan air suling
- 3) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat, pemerataan dengan xilol dan *mounting* dengan resin.

b. Hasil pewarnaan: Daerah kaya protein (sitoplasma, serabut otot, matriks ekstraseluler) tampak berwarna biru.

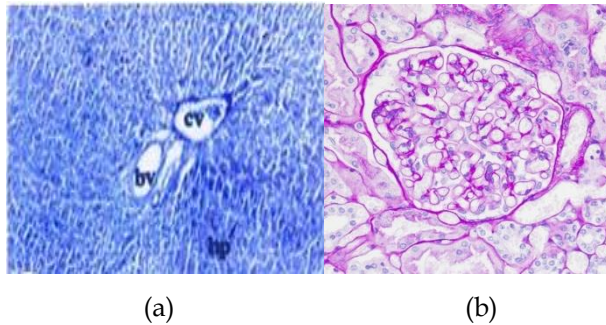
### 2. Ninhidrin-Schiff

Metode ini digunakan untuk mendeteksi gugus amino bebas pada protein dan peptida. Reaksi dimulai dengan perlakuan ninhidrin yang membentuk aldehid, kemudian diikuti dengan pereaksi schiff yang menghasilkan warna ungu kebiruan (Pearse, 1985).

#### a. Tahapan Pewarnaan:

- 1) Deparafinisasi dalam xilol, lalu rehidrasi ke air suling.
- 2) Pewarnaan Ninhidrin: inkubasi dengan Ninhidrin 1-2% yang dilarutkan dalam *buffer* asetat pH $\pm$  5. Pemanasan sekitar 37-50°C selama 30-60 menit. Tahap ini menghasilkan aldehid dari gugus amino. Cuci dengan air suling atau *buffer* untuk menghilangkan sisa pereaksi.

- 3) Reaksi *Schiff* dengan meneteskan *pereaksi Schiff* sehingga akan bereaksi dengan aldehyd.
  - 4) Bilas dengan air mengalir selama 10 menit hingga warna stabil
  - 5) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat, pemerataan dengan xilol dan *mounting* dengan balsam.
- b. Hasil pewarnaan: struktur positif tampak berwarna ungu/merah pada jaringan kaya asam amino.



**Gambar 4.2** Jaringan dengan pewarnaan khas  
 (a) Bromofenol biru (b) Ninhidrin-Schiff  
 (Shati, 2013)

### 3. Histokimia Enzim

Enzim merupakan protein dengan aktivitas katalitik, sehingga teknik pewarnaan histokimia berfokus pada aktivitas enzimatis pada lokasi aslinya didalam jaringan. Prinsip dasarnya adalah penggunaan substrat yang, setelah dihidrolisis atau diubah oleh enzim, menghasilkan produk berwarna atau endapan tidak larut.

Beberapa contoh metode penting:

- a. Fosfatase Asam dan Alkali untuk mendeteksi aktivitas fosfatase pada lisosom (fosfatase asam) atau membran plasma (fosfatase alkali).

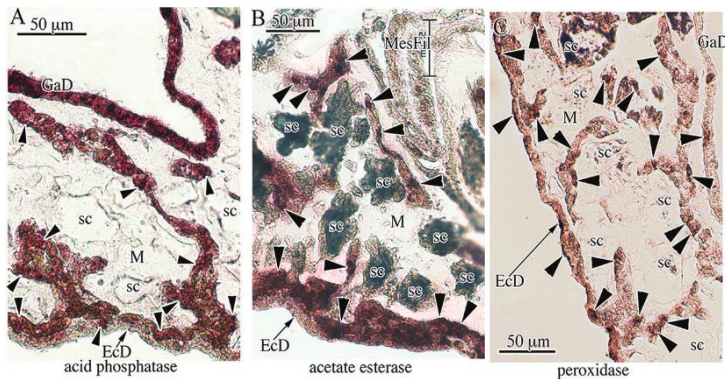
Tahapan pewarnaan:

- 1) Fiksasi menggunakan formalin dingin atau aseton dingin, untuk mempertahankan aktivitas enzim. Pemotongan kriostat setebal 6–8  $\mu\text{m}$ .

- 2) Inkubasi dalam substrat, misalnya  $\alpha$ -naftil fosfat atau sodium glyserofosfat, dalam *buffer* asetat (pH 4,5–5,0) dengan tambahan timbal nitrat sebagai penangkap fosfat. Pencucian dengan *buffer*.
  - 3) Reaksi pewarnaan: perendaman dalam amonium sulfida, menghasilkan PbS berwarna coklat-hitam.
  - 4) *Mounting* dengan media berbasis air.
  - 5) Hasil Pewarnaan: Lisosom dan area kaya fosfatase asam terlihat coklat kehitaman (Bancroft & Gamble, 2019).
- b. Esterase dapat digambarkan dengan substrat yang menghasilkan endapan berwarna setelah dihidrolisis. Digunakan antara lain pada studi hematologi untuk diferensiasi sel darah putih (Rossi & Parra, 2018).
- Tahapan pewarnaan:
- 1) Fiksasi dengan aseton dingin  $\pm 10$  menit. Pematangan kriostat setebal 6–8  $\mu\text{m}$ .
  - 2) Inkubasi dalam substrat, misalnya  $\alpha$ -naftil asetat atau  $\alpha$ -naftil butirat dalam *buffer* fosfat pH 6,0–7,0, dengan tambahan garam diazonium (*Fast Blue B salt*). Pencucian dengan *buffer*.
  - 3) *Counterstain* opsional, misalnya hematoksilin ringan.
  - 4) *Mounting* dengan media berbasis air.
  - 5) Hasil pewarnaan: Aktivitas esterase ditunjukkan oleh presipitat berwarna merah-coklat atau ungu pada sitoplasma. Monosit umumnya menunjukkan reaksi positif kuat, sedangkan granulosit lebih lemah (Bancroft & Gamble, 2019).
- c. Peroksidase akan bereaksi dengan substrat seperti diaminobenzidin (DAB) atau benzidin, menghasilkan endapan coklat gelap pada lokasi aktivitas enzim. Pewarnaan ini banyak digunakan pada studi hematologi dan imunohistokimia (Suvarna et al., 2018).

Tahapan pewarnaan:

- 1) Fiksasi umumnya dengan etanol atau formalin netral. Pemotongan kriostat atau parafin dengan ketebalan 5–7  $\mu\text{m}$ .
- 2) Inkubasi substrat dalam campuran  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan donor kromogen (DAB). Pencucian dengan *buffer*.
- 3) Pewarna tandingan opsional dengan hematoksilin untuk memperjelas inti.
- 4) *Mounting* menggunakan resin.
- 5) Hasil pewarnaan: Granula neutrofil dan eosinofil menunjukkan reaksi positif peroksidase dengan warna coklat kehitaman (Kiernan, 2008; Bancroft & Gamble, 2019).



**Gambar 4.3** Jaringan dengan pewarnaan khas (a). Fosfatase asam, (b)esterase, (c) peroksidase (Menzel, 2015)

## E. Pewarnaan Lipid

Lipid merupakan komponen penting sel yang berfungsi sebagai cadangan energi, penyusun membran sel, serta mediator sinyal biologis. Metode pewarnaan lipid memungkinkan identifikasi lokalisasi dan jenis lipid dalam jaringan, yang tidak bisa dicapai dengan teknik biokimia ekstraktif. Dengan demikian, pewarnaan ini melengkapi analisis molekuler dalam memahami patogenesis penyakit yang melibatkan gangguan metabolisme lipid (Kiernan, 2008).

Berbeda dengan protein dan karbohidrat, lipid mudah larut dalam pelarut organik. Oleh karena itu, teknik pewarnaan lipid memerlukan pemrosesan jaringan khusus, biasanya menggunakan fiksasi beku agar lipid tidak larut selama proses persiapan (Suvarna et al., 2018).

### 1. Pewarnaan Sudan

Kelompok pewarna Sudan yaitu Sudan III, Sudan IV, Sudan Black B (SBB), dan Minyak merah O (*Oil Red O*) merupakan pewarna lipofilik yang larut dalam lipid, tetapi tidak larut dalam air. Pewarna ini bekerja dengan prinsip *old-fashioned solubility staining*, yaitu pewarna larut dalam lipid pada jaringan dan mengendap, menghasilkan warna spesifik (Pearse, 1985).

#### a. Tahapan Pewarnaan

- 1) Fiksasi Jaringan menggunakan formalin buffer netral 10% atau formal-kalsium. Jaringan tidak boleh melalui proses pelarut organik. Potong kriostat tebal 8-10  $\mu\text{m}$ , ditempel pada kaca objek
- 2) Pewarnaan utama inkubasi dalam larutan minyak merah O dalam isoproponal atau SBB (larut dalam propilen glikol) selama 10-15 menit. Pewarna larut dalam lipid sehingga tetesan lipid berwarna merah atau hitam kebiruan.
- 3) Cuci dengan larutan buffer atau akuades cepat
- 4) *Counterstain* dengan hematoksilin ringan memberikan inti sel tampak biru
- 5) *Mounting* menggunakan media berbasis air (aquateks atau gliserin gelatin), karena *mounting* resin organik dapat melarutkan lipid.

#### b. Hasil Pewarnaan

Lipid netral (trigliserida, kolesterol ester):

- 1) Sudan III dan Sudan IV: memberi warna merah-oranye pada lipid netral.
- 2) SBB: mewarnai fosfolipid dan lipoprotein dengan warna hitam kebiruan.

- 3) Minyak Merah O: sangat populer karena kontras yang baik, menghasilkan warna merah pada lipid netral (Bancroft & Gamble, 2019).

## 2. Pewarnaan Osmium Tetroksida

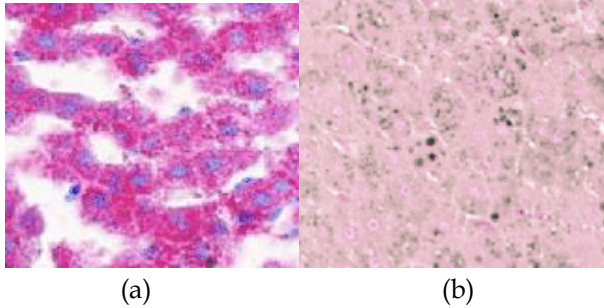
Osmium tetroksida ( $\text{OsO}_4$ ) berfungsi sebagai fiksatif sekaligus pewarna lipid. Osmium bereaksi dengan ikatan rangkap pada asam lemak tak jenuh sehingga menghasilkan warna hitam permanen (Rossi & Parra, 2018). Osmium tetroksida adalah zat sangat toksik, korosif, dan volatil. Pemakaiannya harus dilakukan di dalam lemari asam dengan APD lengkap (masker karbon aktif, sarung tangan, pelindung mata).

### a. Tahapan pewarnaan

- 1) Fiksasi Jaringan menggunakan formalin buffer netral 10 % dan jangan menggunakan pelarut organik. Potong kriostat tebal 8-10  $\mu\text{m}$  pada sediaan jaringan beku.
- 2) Inkubasi dalam larutan  $\text{OsO}_4$  1-2% selama 30 menit – 2 jam pada suhu kamar.  $\text{OsO}_4$  akan bereaksi dengan ikatan rangkap lipid tak jenuh, menghasilkan endapan hitam-coklat. Cuci dengan akuades
- 3) *Counterstain* (opsional) dengan hematoksilin ringan untuk memperjelas inti.
- 4) *Mounting* dengan media berbasis air untuk menjaga kestabilan lipid.

### b. Hasil pewarnaan:

- 1) Lipid tak jenuh berwarna hitam coklat.
- 2) Membran sel (karena kaya fosfolipid) tampak hitam.
- 3) Inti dan sitoplasma bukan lipid tetap pucat.



**Gambar 4.4** Jaringan dengan pewarnaan khas  
 (a). Minyak merah O (b) Osmium Tetroksida  
 (Bagley, B., Chang, SC., Ehresman, D., Eveland, A., Zitzow, J., et al. 2017)

## F. Pewarnaan Asam Nukleat

Pewarnaan asam nukleat memberikan informasi tentang struktur inti, aktivitas transkripsi, serta status genetik sel. Hal ini menjadikan metode pewarnaan DNA dan RNA penting baik dalam diagnostik histopatologi maupun riset biomedis (Kiernan, 2008; Bancroft & Gamble, 2019). Pewarnaan histokimia asam nukleat umumnya didasarkan pada kemampuan pewarna basa untuk berikatan dengan gugus fosfat bermuatan negatif pada DNA dan RNA. Beberapa metode juga bersifat selektif untuk membedakan DNA dan RNA, sehingga dapat digunakan untuk mempelajari aktivitas seluler tertentu (Suvarna et al., 2018).

### 1. Hematoksilin

Hematoksilin merupakan pewarna inti paling umum digunakan dalam histologi. Hematoksilin berperan sebagai pewarna basa yang berikatan dengan DNA di inti, menghasilkan warna biru keunguan.

#### a. Tahapan pewarnaan

- 1) Deparafinasi dalam xilol dilanjutkan dehidrasi bertingkat melalui alkohol absolut kemudian alkohol 70% dan kemudian air.
- 2) Pewarnaan hematoksilin dengan merendam preparat dalam larutan hematoksilin selama 5-10 menit. Cuci dengan air mengalir

- 3) Diferensiasi dengan dicelup cepat dalam asam alkohol (alkohol 70% ditambah HCl 1%) untuk menghilangkan pewarna non-spesifik sehingga mengubah warna inti dari ungu menjadi biru.
  - 4) *Counterstain* (opsional, misalnya eosin). Sitoplasma merah muda dan serabut kolagen merah muda terang.
  - 5) Dehidrasi dan *Mounting* dengan alkohol bertingkat, pemerataan dengan xilol dan *mounting* dengan resin.
- b. Hasil pewarnaan:
- 1) Inti sel (DNA, RNA) tampak biru keunguan (hematoksilin).
  - 2) Sitoplasma biasanya merah muda (jika dikombinasi dengan eosin).
  - 3) Matriks ekstraseluler bervariasi sesuai jaringan (Bancroft & Gamble, 2019).

## 2. Reaksi Feulgen

Metode Feulgen merupakan teknik histokimia spesifik DNA. Prinsipnya, DNA dihidrolisis dengan asam HCl sehingga terbentuk aldehyd dari deoksiribosa, yang kemudian bereaksi dengan pereaksi schiff menghasilkan warna merah keunguan.

- a. Tahapan pewarnaan
- 1) Fiksasi dengan Karnoy Fiksatif atau formalin netral buffer.
  - 2) Hidrolisis asam dengan HCl 1N pada 60 °C (5-10 menit). Cuci cepat dengan air suling dingin.
  - 3) Pewarnaan dengan pereaksi Schiff (10-30 menit). Cuci dalam air mengalir (meningkatkan intensitas warna).
  - 4) Dehidrasi dengan alkohol bertingkat, pemerataan dengan xilol dan *mounting* dengan balsam
- b. Hasil pewarnaan
- DNA inti sel positif tampak merah keunguan, sedangkan RNA negatif (tidak berwarna).

### 3. Pewarna metil hijau-pironin

Metode ini digunakan untuk membedakan DNA dan RNA berdasarkan afinitas pewarna. Metil hijau berikatan selektif dengan DNA (berwarna hijau), sedangkan pironin berikatan dengan RNA (berwarna merah).

#### a. Tahapan pewarnaan

- 1) Fiksasi dengan karnoy atau formalin netral buffer.
- 2) Hidrolisis ringan (opsional, HCl 1N singkat) untuk meningkatkan aksesibilitas nukleotida.
- 3) Pewarnaan dengan larutan metil hijau-pironin (15-30 menit).
- 4) Cuci dengan buffer fosfat untuk menghilangkan pewarna bebas.
- 5) Dehidrasi cepat, pemerataan, dan *mounting*

#### b. Hasil pewarnaan

DNA (inti) tampak hijau, RNA (sitoplasma) tampak merah.

### 4. Akridin Oranye

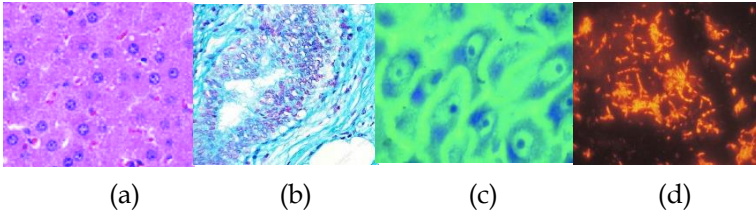
Akridin Oranye merupakan pewarna fluoresen yang dapat menginterkalasi dengan asam nukleat. Akridin Oranye menghasilkan fluoresensi hijau bila berikatan dengan DNA dan fluoresensi merah-oranye bila berikatan dengan RNA.

#### a. Tahapan pewarnaan

- 1) Fiksasi dengan etanol atau karnoy fiksatif.
- 2) Hidrolisis ringan (opsional) dengan HCl.
- 3) Pewarnaan dengan larutan akridin oranye (0,01-0,05%) selama 5-10 menit.
- 4) Cuci cepat dalam buffer sitrat atau PBS.
- 5) *Mount Dalam* medium *anti-fade*.
- 6) Amati dengan mikroskop fluoresensi (*filter* hijau & oranye).

#### b. Hasil pewarnaan

DNA fluoresensi warna hijau dan RNA fluoresensi warna oranye-merah



**Gambar 4.5** Jaringan dengan pewarnaan khas (a). Hematoksilin (b) Metode Feulgen, (c) Metil hijau-Pironin, (d) Akridin Oranye (Bancroft, JD& Gamble, M, 2019 dan Carson, FL &Hladik, C, 2009)

## G. Pewarnaan Zat Anorganik

Zat anorganik seperti kalsium, besi, dan tembaga dapat terdeposit dalam jaringan akibat proses fisiologis normal maupun kondisi patologis. Identifikasi histokimia deposit anorganik sangat penting karena dapat membantu diagnosis penyakit metabolik, gangguan hematologi, hingga penyakit degeneratif (Bancroft & Gamble, 2019).

Berbeda dengan protein, karbohidrat, lipid, atau asam nukleat, pewarnaan anorganik umumnya didasarkan pada reaksi kimia spesifik antara ion logam dengan pereaksi histokimia, menghasilkan endapan berwarna yang menunjukkan lokasi deposit (Kiernan, 2008).

### 1. Pewarnaan Kalsium

Kalsium sering terdeposit dalam jaringan akibat proses kalsifikasi distrofik (misalnya pada nekrosis) atau kalsifikasi metastatik (misalnya akibat hiperkalsemia).

Metode Von Kossan menggunakan perak nitrat yang bereaksi dengan ion fosfat atau karbonat pada kalsium, membentuk endapan perak fosfat/karbonat yang kemudian direduksi menjadi warna hitam oleh cahaya.

#### a. Tahapan pewarnaan

- 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades.
- 2) Inkubasi dalam larutan perak nitrat 5% di bawah cahaya terang (30–60 menit). Cuci dengan air suling.

- 3) Reduksi dengan sodium tiosulfat 5% (untuk menghentikan reaksi perak).
  - 4) *Counterstain* dengan *nuclear fast red*.
  - 5) Dehidrasi, pemerataan, *mounting*.
- b. Hasil pewarnaan
- 1) Endapan kalsium tampak hitam/coklat tua.
  - 2) Inti sel tampak merah.

## 2. Pewarnaan Besi

Deposit besi dalam jaringan, terutama dalam bentuk hemosiderin, dapat muncul pada perdarahan kronis, hemokromatosis, atau hemosiderosis. Metode Pengecatan Biru Prusia (*Perls' Prussian Blue*) dengan pereaksi kalium ferosianida bereaksi dengan ion besi feri ( $Fe^{3+}$ ), membentuk senyawa biru (feroferisianida).

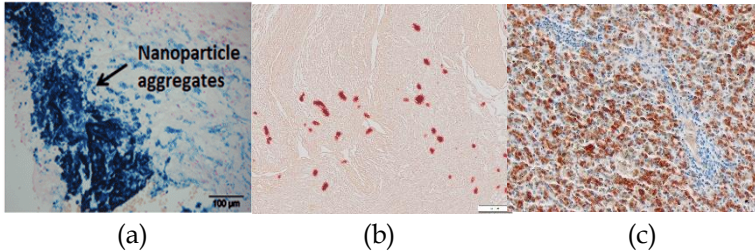
- a. Tahapan pewarnaan
- 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades. Inkubasi dalam campuran HCl 2% + potasium ferosianida 2% selama 20–30 menit. Cuci dengan air suling.
  - 2) *Counterstain* dengan *nuclear fast red* tampak inti sel merah.
  - 3) Dehidrasi, pemerataan, *mounting*.
- b. Hasil pewarnaan
- Endapan besi tampak biru, inti sel dapat dikontraskan dengan *nuclear fast red* berwarna merah.

## 3. Pewarnaan Tembaga

Akumulasi tembaga dapat terjadi pada penyakit metabolik, misalnya penyakit Wilson, atau akibat kerusakan hepatoseluler. Metode *Rubeanic Acid* tembaga bereaksi dengan rubeanic acid menghasilkan endapan hijau gelap.

- a. Tahapan pewarnaan
- 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades.
  - 2) Inkubasi dengan larutan asam rubeanik dalam etanol selama 1–2 jam. Cuci dengan buffer.

- 3) *Counterstain* opsional dengan hematoksilin.
  - 4) *Mounting* berbasis air.
- b. Hasil pewarnaan: Endapan tembaga tampak hijau tua-hitam dan Inti sel tampak biru.



**Gambar 4.6** Pewarnaan zat anorganik (a) besi, (b) Kalsium, (c) Tembaga  
(Bainton, 2022 & Webpath, 2022)

## H. Pewarnaan Pigmen

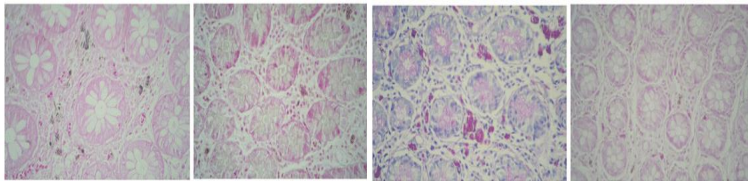
Pigmen dalam jaringan bisa dibagi menjadi pewarnaan endogen dan eksogen. Beberapa pigmen bisa diidentifikasi langsung karena sifat autokromogenik (sudah berwarna alami), tetapi ada pula metode khusus untuk konfirmasi (Kiernan, 2008; Bancroft & Gamble, 2019).

Pigmen endogen adalah zat berwarna yang terbentuk secara fisiologis atau patologis dalam tubuh. Beberapa yang penting antara lain pewarnaan pigmen Melanin, Liofusin dan Hemosiderin.

1. Pewarnaan Melanin merupakan pigmen coklat-hitam yang terdapat pada kulit, rambut, retina, dan beberapa jaringan saraf.
  - a. Tahapan pewarnaan
    - 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades
    - 2) Inkubasi dengan larutan perak nitrat 10% untuk melanin mereduksi perak. Cuci dengan akuades.
    - 3) *Counterstain* dengan *nuclear fast red*.
    - 4) Dehidrasi, pemerataan, *mounting*.

- b. Hasil pewarnaan: Melanin tampak hitam pekat, inti tampak merah.
  2. Pewarnaan Lipofuscin merupakan pigmen keemasan hasil degradasi lipid dan protein pada lisosom, sering ditemukan pada penuaan sel.
    - a. Tahapan pewarnaan
      - 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades
      - 2) Inkubasi dengan larutan ferisianida dan besi klorida. Lipofuscin mereduksi ferisianida sehingga menghasilkan endapan biru-hijau.
      - 3) *Counterstain* opsional.
    - b. Hasil pewarnaan: Lipofuscin tampak biru-hijau.
  3. Pewarnaan Hemosiderin merupakan pigmen cokelat keemasan yang berasal dari degradasi hemoglobin.
    - a. Tahapan Pewarnaan
      - 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades.
      - 2) Inkubasi dalam campuran HCl 2% + potassium ferisianida 2% selama 20–30 menit. Akan membentuk feri ferisianida. kemudian Cuci dengan air suling.
      - 3) *Counterstain* dengan *nuclear fast red* tampak inti sel merah.
      - 4) Dehidrasi, pemerataan, *mounting*.
    - b. Hasil pewarnaan: Hemosiderin tampak biru, inti tampak merah.
  4. Pewarnaan Bilirubin (pigmen empedu) Bilirubin dapat dideteksi dengan Tes Fouchet (oksidasi menjadi biliverdin).
    - a. Tahapan pewarnaan
      - 1) Deparafinisasi dalam xilol, kemudian rehidrasi melalui seri alkohol (100%, 95%, 70%) ke akuades.
      - 2) Inkubasi dengan pereaksi Fouchet Fouchet (asam trikloroasetat + besi klorida). Cuci dengan air.
    - b. Hasil Pewarnaan: Bilirubin tampak berwarna hijau cerah (biliverdin).

5. Pewarnaan Pigmen Eksogen berasal dari luar tubuh dan dapat terdeposit dalam jaringan.
- Karbon (Antrakosis): sering ditemukan di paru pekerja tambang atau perokok, tampak sebagai endapan hitam yang tidak larut. Tidak memerlukan pewarnaan khusus, tetapi dapat divisualisasi langsung (Kiernan, 2008).
  - Tinta India (India Ink): digunakan untuk mendeteksi keberadaan partikel di sistem limfatik atau fagositosis oleh makrofag.
  - Pigmen logam berat (misalnya timbal, merkuri): dapat divisualisasi dengan teknik khusus seperti autometallography (Rossi & Parra, 2018).



(a)

(b)

(c)

(d)

**Gambar 4.7** Pewarnaan pigmen (a) Melanin, (b) Hemosiderin, (c) Lipofuscin, (d) Bilirubin (NTP, 2015)

## DAFTAR PUSTAKA

- Bagley, B., Chang, SC., Ehresman, D.,Eveland, A.,Zitzow, J.,et al. (2017) *Perfluorooctane Sulfonate-Induced Hepatic Steatosis in Male Sprague Dawley Rats Is Not Attenuated by Dietary Choline Supplementation*. *Toxicological sciences*. Journal of the Society of Toxicology. Vol 160. DOI: 10.1093/toxsci/kfx185
- Bainton, D.F. (2022) *Perls' Prussian Blue Stain for Hemosiderin*. University of Utah WebPath. Available at: <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/IRON.PDF> (Accessed: 19 September 2025).
- Bancroft JD, Gamble M. (2019) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 8th ed. Elsevier.
- Carson, F.L. & Hladik, C. (2009) *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd edn. Chicago: ASCP Press. (Ilustrasi hasil Methyl Green–Pyronin dan Feulgen stain).
- Cohen, M., Varki, N.,Jankowski, M., Gagneux, P. (2012) *Using Unfixed, Frozen Tissues to Study Natural Mucin Distribution*. *Journal of visualized experiments : JoVE* . VoL (67). DOI:10.3791/3928
- Kiernan JA. (2008) *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Scion Publishing.
- Menzel, Lorenzo& Bigger, Charles. (2015) *Identification of Unstimulated Constitutive Immunocytes, by Enzyme Histochemistry, in the Coenenchyme of the Octocoral *Swiftia exserta**. *Biological Bulletin* .Vol (229). DOI:10.1086/BBLv229n2p199
- National Toxicology Program (NTP) (2015) *Nonneoplastic Lesion Atlas: Brain – Pigment*. Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/nml/brain/pigment/index.htm> (Accessed: 19 September 2025).

- National Toxicology Program (NTP) (2015) *Nonneoplastic Lesion Atlas: Lymph Node - Pigment*. Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/nml/lymph-node/pigment/index.htm> (Accessed: 19 September 2025).
- Pearse AGE. (1985) *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Vol 2. Churchill Livingstone.
- Rossi MA, Parra ER. (2018) "*Histochemistry: Methods and Protocols.*" *Methods in Molecular Biology*. Springe
- Shati, Ali. (2013) *Ameliorative effect of vitamin E on potassium dichromate-induced hepatotoxicity in rats*. *Journal of King Saud University - Science*. Vol (26). Doi:10.1016/j.jksus.2013.12.001
- Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. (2018) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier.
- WebPath (2022) *Alizarin Red S - Calcium stain*. University of Utah. Available at: <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/ALIZARIN.PDF> (Accessed: 19 September 2025).
- WebPath (2022) *Copper - Rhodanine method*. University of Utah. Available at: <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/COPPER.PDF> (Accessed: 19 September 2025).

# BAB 5

## PEMBUATAN PREPARAT HISTOKIMIA

dr. Triani Hastuti Hatta, Sp. DVE., M.Kes., M.HPE., FINSDV.

### A. Pendahuluan

Histokimia merupakan cabang histologi yang mempelajari distribusi dan identifikasi komponen kimiawi sel maupun jaringan dengan menggunakan teknik pewarnaan khusus. Istilah “histo” merujuk pada jaringan, sedangkan “kimia” merujuk pada analisis komponen molekuler yang membentuk jaringan tersebut. Dengan demikian, histokimia tidak hanya mempelajari struktur, tetapi juga memberikan pemahaman mengenai komposisi biokimia dan aktivitas metabolik yang mendasari fungsi sel dan organ (Hart et al., 2025).

Dalam praktik laboratorium, preparat histokimia disiapkan melalui serangkaian prosedur teknis mulai dari fiksasi, dehidrasi, embedding, hingga pewarnaan menggunakan reagen khusus. Mescher (2018) menekankan bahwa tujuan utama pembuatan preparat histologis, termasuk histokimia, adalah menjaga struktur jaringan sedekat mungkin dengan keadaan *in vivo* agar dapat dipelajari secara mikroskopis.

Pentingnya preparat histokimia tidak hanya pada bidang riset dasar biomedis, tetapi juga pada diagnostik klinis. Di bidang patologi, teknik histokimia membantu mengidentifikasi kelainan metabolik, mendeteksi keberadaan zat tertentu pada tumor, serta mendukung evaluasi penyakit degeneratif. Histokimia juga menjadi pelengkap bagi teknik modern lain

seperti imunohistokimia atau histologi molekuler, karena memberikan gambaran distribusi zat kimia pada level jaringan secara langsung.

## **B. Bahan dan Peralatan**

Pembuatan preparat histokimia memerlukan kombinasi bahan kimia dan peralatan laboratorium yang sesuai agar hasil yang diperoleh akurat serta dapat direproduksi.

### **1. Bahan Kimia**

Bahan kimia yang digunakan dalam histokimia terdiri dari:

- a. Sampel jaringan misalnya jaringan hewan atau manusia (sesuai etika penelitian).
- b. Larutan fiksatif, contoh formalin 10%, glutaraldehida, atau Bouin's solution untuk menjaga struktur jaringan (dijelaskan lebih lanjut pada fiksasi jaringan).
- c. Larutan pembedaman menggunakan parafin atau resin (dijelaskan lebih lanjut pada pembedaman jaringan).
- d. Alkohol bertingkat (70%, 80%, 95%, 100%) untuk dehidrasi jaringan dan rehidrasi jaringan.
- e. Xylol atau toluena sebagai *clearing agent*.
- f. Air suling untuk rehidrasi dengan metode *Projected Hot Air Deparaffinization*.

### **2. Alat Laboratorium**

Alat-alat utama yang digunakan dalam proses pembuatan preparat histokimia meliputi:

- a. Mikrotom digunakan untuk memotong jaringan menjadi irisan tipis (3–10  $\mu\text{m}$ ).
- b. Pisau mikrotom (pisau sekali pakai) digunakan sebagai pemotong jaringan pada mikrotom.
- c. *Water bath* (bak apung) sebagai tempat meletakkan irisan jaringan agar tidak menggulung.
- d. *Object glass* (slide kaca) sebagai media untuk menempelkan irisan jaringan.
- e. *Cover glass* merupakan penutup preparat setelah pewarnaan.

- f. Forcep, jarum preparat, kuas halus digunakan sebagai alat yang membantu memindahkan potongan jaringan.
- g. Botol pewarna atau tabung reaksi kecil sebagai wadah untuk larutan pewarna histokimia.
- h. Inkubator atau oven digunakan untuk mengeringkan slide setelah irisan ditempel.
- i. Hair dryer digunakan pada deparafinisasi.

### C. Tahap-Tahap Pembuatan Preparat Histokimia

Pembuatan preparat histokimia merupakan proses sistematis yang terdiri atas beberapa tahap teknis. Setiap tahap memiliki tujuan spesifik untuk mempertahankan struktur jaringan sekaligus memungkinkan deteksi komponen kimiawi tertentu.

#### 1. Pengambilan Jaringan (*Sampling*)

Tahap awal dimulai dari pengambilan jaringan. Pengambilan harus dilakukan secara atraumatik untuk mencegah artefak struktural. Menurut Golberg et al. (2024), kualitas awal sampel sangat menentukan keberhasilan tahap berikutnya. Pada penelitian biomedis, sampel sering berasal dari biopsi atau organ percobaan hewan. Pada kasus klinis, biopsi diagnostik memerlukan kecepatan dan ketepatan agar tidak terjadi autolisis. Jaringan harus segera diproses setelah diambil untuk mencegah autolisis dan degradasi.

Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan, yaitu:

- a. Ukuran sampel (jaringan), tidak boleh lebih tebal dari 5 mm agar penetrasi fiksatif optimal (Mescher, 2018). Terdapat referensi lain juga yang menyatakan ketebalan ideal jaringan adalah 4-6 mm, hal ini disebabkan bila jaringan terlalu tipis, dapat menyebabkan jaringan menjadi rapuh atau terlalu keras, sebaliknya, bila jaringan terlalu tebal akan menyulitkan zat fiksatif menembus bagian dalam jaringan sehingga menyebabkan autolisis pada bagian tersebut.

- b. Teknik pengambilan, harus dilakukan secara presisi dan hati-hati, hindarkan trauma yang tidak perlu, dan terutama untuk pengambilan area kecil yang memiliki struktur anatomi kompleks, menggunakan pisau atau gunting tajam untuk menghindari robekan jaringan. Hindari kompresi jaringan dengan pinset atau kontaminasi darah berlebih yang dapat menimbulkan artefak pewarnaan (Golberg et al., 2024).

## 2. Fiksasi Jaringan (*Fixation*)

Jaringan yang berasal dari sampel organ yang akan diperiksa menggunakan mikroskop, harus segera setelah diambil dari tubuh, ditempatkan pada wadah berisikan larutan senyawa penstabil atau pengikat silang yang dikenal sebagai fiksatif. Proses perendaman jaringan dengan fiksatif ini disebut sebagai proses fiksasi (Mescher, 2018).

Fiksasi memiliki beberapa tujuan, yaitu: (Bhat & Hussein, 2021)

- a. Mencegah perubahan pasca mortem seperti autolisis (kerusakan sel oleh enzim) dan putrefaksi (kerusakan jaringan oleh bakteri).
- b. Menjaga senyawa kimia dan struktur mikroanatomi jaringan agar analisis histokimia dapat dilakukan.
- c. Mengubah konsistensi jaringan dari semifluid menjadi semisolid sehingga memudahkan manipulasi jaringan. Hal ini dikenal sebagai proses solidifikasi.
- d. Memungkinkan pengerasan jaringan lunak seperti usus dan otak dengan mudah.
- e. Meningkatkan karakter pewarnaan jaringan oleh beberapa zat fiksatif.

Dalam proses fiksasi, terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan, yaitu ukuran sampel jaringan, suhu tempat fiksasi dilakukan konsentrasi zat fiksatif, dan durasi fiksasi. Ukuran jaringan sudah dibahas pada pengambilan sampel jaringan. Suhu optimal untuk tempat proses fiksasi adalah berkisar antara 37°C hingga 45°C. Suhu yang sangat tinggi

meningkatkan risiko autolisis, sedangkan suhu rendah dapat memperlambat laju difusi fiksatif. Konsentrasi fiksatif yang digunakan harus sesuai dengan standar yang telah ditentukan secara eksperimental sehingga dapat memastikan penetrasi fiksatif berlangsung dengan baik tanpa merusak jaringan dan membutuhkan waktu yang tidak lama. Durasi fiksasi bergantung pada jenis jaringan, ukuran dan jenis fiksatif yang digunakan. Fiksasi semalaman biasanya disarankan untuk sebagian besar sampel jaringan agar hasil fiksasi maksimal, disarankan tidak terlalu lama dari itu karena bisa menyebabkan jaringan rapuh (Bhat & Hussein, 2021). Formalin menembus jaringan dengan kecepatan rata-rata 1 mm/jam, sehingga waktu fiksasi standar adalah minimal 5 jam untuk sampel kecil dan 12 jam atau lebih untuk spesimen besar. Durasi fiksasi lebih dari 36 jam menyebabkan over-fiksasi sehingga dibatasi kegunaannya dalam imunohistokimia dan studi molekuler (Golberg et al., 2024).

Berdasarkan komposisinya, bahan fiksatif terbagi menjadi (Bhat & Hussein, 2021):

- a. Simple fixatives, memiliki komposisi tunggal sebagai bahan aktif utama seperti formaldehide, ethanol atau osmium tetroxide.
- b. Compound fixatives, memakai kombinasi beberapa bahan aktif fiksatif yang bertujuan mengurangi kelemahan salah satu bahan, contohnya adalah larutan Bouin dan larutan Zenker.

Bahan fiksatif yang umum digunakan untuk histokimia dasar adalah formalin 10% (Mescher, 2018) dan formalin buffer netral 10%, merupakan larutan formaldehida 3,7% dengan pH sekitar 7 (Golberg et al., 2024).

Ada beberapa metode aplikasi bahan fiksatif, yaitu (Hart et al., 2025):

- a. Immersion fixation, yaitu sampel direndam dalam bahan fiksatif.
- b. Coating fixation, yaitu sampel disemprot dengan bahan fiksatif.

- c. Vapor fixation, sampel diberi uap bahan fiksatif.
- d. Perfusion fixation, sistem arteri hewan di infus dengan larutan fiksatif untuk fiksasi seluruh tubuh.
- e. Freeze-Drying, sampel dibekukan dengan cepat dan penghilangan air pada sampel dengan cara sublimasi.
- f. Microwave fixation, menggunakan energi gelombang mikro untuk mempercepat proses fiksasi.

### 3. Dehidrasi

Proses dehidrasi merupakan tahap penting yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan agar dapat diresapi oleh media *embedding* (parafin), memastikan bahwa jaringan tetap terjaga strukturnya dan siap untuk dipotong menjadi irisan tipis untuk analisis mikroskopis (Hart et al., 2025).

Bahan yang digunakan pada proses dehidrasi adalah seri alkohol dengan konsentrasi bertingkat, dimulai dari konsentrasi rendah ke tinggi: 50%, 70%, 95%, hingga 100%. Prosedur dehidrasi dilakukan dengan cara memindahkan jaringan secara berurutan ke dalam larutan alkohol, sebagai berikut:

- a. Alkohol 50% selama 60 menit
- b. Alkohol 70% selama 60 menit
- c. Alkohol 95% sebanyak 2 kali, yaitu 60 menit dilanjutkan selama 40 menit.
- d. Alkohol 100% sebanyak dua kali, yaitu 60 menit dilanjutkan selama 40 menit (Golberg et al., 2024).

Hal-hal yang perlu diperhatikan (Golberg et al., 2024; Hart et al., 2025):

- a. Urutan dan konsentrasi larutan, untuk memastikan penghilangan air secara bertahap dan mencegah kerusakan jaringan.
- b. Durasi pemendaman. Waktu perendaman di setiap larutan harus cukup untuk memastikan penghilangan air sepenuhnya, tetapi tidak terlalu lama agar tidak

- menyebabkan kerusakan jaringan atau perubahan struktur.
- c. Jenis larutan. Jenis larutan adalah jenis alkohol, etanol atau aseton, yang efektif dalam menghilangkan air dari jaringan.
  - d. Kebersihan larutan. Larutan harus diganti secara berkala untuk mencegah kontaminasi yang dapat memengaruhi hasil akhir.

Setelah proses dehidrasi, langsung dilanjutkan dengan *clearing*.

#### 4. *Clearing*

Proses dehidrasi langsung diikuti dengan proses *clearing*, yaitu mengganti alkohol dengan pelarut organik (seperti xylol, xylene atau toluena) yang kompatibel dengan media embedding. *Clearing* menggantikan alkohol dengan pelarut organik yang bisa bercampur dengan parafin. *Clearing* juga membuat jaringan menjadi lebih transparan, menandakan keberhasilan proses ini. (Mescher, 2018).

Proses *clearing* dilakukan dengan perendaman jaringan dalam dua tahap, xylene selama 60 menit, kemudian diikuti dengan xylene berikutnya selama 30 menit. Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan, yaitu:

- a. Durasi perendaman, harus cukup untuk memastikan penggantian total cairan dehidrasi dengan xylene, tetapi tidak terlalu lama agar tidak merusak struktur jaringan.
- b. Kondisi jaringan. Jaringan harus sepenuhnya terendam dalam xylene untuk memastikan penetrasi yang merata.
- c. Kebersihan xylene harus terjaga, bebas dari kontaminasi untuk mencegah artefak pada jaringan.
- d. Ventilasi. Xylene adalah bahan kimia yang mudah menguap dan beracun. Oleh karena itu, proses ini harus dilakukan di ruang dengan ventilasi yang baik atau di bawah lemari asam.

- e. Kompatibilitas dengan Parafin. Pastikan clearing agent (xylene) benar-benar menggantikan cairan dehidrasi agar jaringan siap untuk impregnasi dengan parafin. (Golberg et al., 2024)

## 5. Infiltrasi dan Pemendaman Jaringan (*Infiltration and Embedding*)

Tahap berikutnya adalah infiltrasi jaringan atau biasa disebut dengan impregnasi jaringan. Proses ini menghasilkan blok jaringan keras yang dapat dipotong tipis menggunakan mikrotom (Mescher, 2018).

Langkah-langkah pada infiltrasi dan pemendaman adalah:

- a. Pemanasan parafin, biasanya digunakan parafin dengan titik leleh rendah sekitar 55°C-63°C. Parafin yang dipanaskan tersebut dibuat hingga mencair.
- b. Proses impregnasi, yaitu perendaman jaringan dalam beberapa bak parafin cair yang panas, dengan urutannya pada bak 1, parafin yang mengandung campuran xylene dari tahap clearing sebelumnya, selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian diikuti dengan perendaman jaringan pada bak 2, 3, dan 4 yang mengandung parafin murni cair selama 30 menit masing-masing bak pada suhu 60°C. Perendaman jaringan harus bebas kontaminasi untuk mencegah artefak pada jaringan. Jaringan harus ditempatkan dengan posisi semua terendam agar impregnasi merata. Jaringan yang direndam tersebut diletakkan dalam cetakan
- c. Durasi total proses impregnasi hingga 720 menit, tergantung ukuran dan jenis jaringan.
- d. Jaringan didinginkan hingga mengeras dan siap untuk dilakukan proses berikutnya, yaitu *sectioning*. Blok jaringan parafin ini yang mengeras ini disebut formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue block (Golberg et al., 2024).

## 6. Pemotongan Jaringan (*Sectioning*)

Blok jaringan FFPE dipotong dengan mikrotom. Ketebalan potongan standar untuk cahaya adalah 3–10  $\mu\text{m}$ , sedangkan untuk histokimia enzimatik sering lebih tipis untuk menjaga distribusi enzim (Mescher, 2018). Untuk preparat beku, digunakan cryostat yang mampu menghasilkan potongan 5–20  $\mu\text{m}$  tanpa tahap dehidrasi atau embedding, sehingga enzim atau lipid tetap terjaga (Golberg et al., 2024).

Terdapat hal-hal yang perlu diperhatikan saat *sectioning* blok FFPE ini, yaitu:

- a. Kerapuhan irisan. Irisan parafin sangat tipis dan rapuh, sehingga harus ditangani dengan hati-hati.
- b. Kebersihan mikrotom. Pisau mikrotom harus tajam dan bersih untuk menghasilkan irisan yang halus tanpa artefak.
- c. Posisi jaringan. Jaringan harus diposisikan dengan benar pada blok parafin untuk memastikan pemotongan yang optimal.
- d. Ketebalan irisan preparat harus seragam dan konsisten untuk mendapatkan hasil pengamatan yang akurat.

Hasil proses *sectioning* adalah slide jaringan yang siap untuk tahap berikutnya, yaitu deparafinisasi, rehidrasi dan pewarnaan (*staining*).

## 7. Deparafinisasi dan rehidrasi (*Deparaffinization and rehydration*)

Tahap deparafinisasi adalah untuk menghilangkan parafin dari potongan jaringan histologi yang telah dipendam dalam parafin. Parafin bersifat tidak larut dalam air, sehingga harus dihilangkan agar jaringan dapat berinteraksi dengan pewarna berbasis air atau larutan pewarna histologi lainnya. Proses ini penting untuk memastikan pewarnaan yang efektif dan hasil mikroskopis yang jelas. Deparafinisasi dilanjutkan dengan rehidrasi, yaitu

perendaman jaringan dalam air dengan tujuan mengembalikan jaringan ke kondisi yang memungkinkan interaksi dengan pewarna berbasis air dengan melakukan hidrasi ulang pada jaringan tersebut. (Marinho & Hanscheid, 2023).

Cara lama untuk tahap deparafinasi adalah dengan menggunakan bahan xylene, di mana pada proses ini, lilin parafin yang ada pada blok jaringan dilelehkan dan dihilangkan. Setelah proses ini, dilanjutkan dengan tahap dehidrasi menggunakan alkohol. Adapun proses deparafinasi dan rehidrasi dengan cara ini adalah (Golberg et al., 2024):

- a. Blok jaringan FFPE direndam dalam xylene selama 90 menit dibagi dua tahap, yaitu xylene pertama selama 60 menit kemudian dilanjutkan xylene kedua selama 30 menit.
- b. Kemudian dilanjutkan dengan rehidrasi, yaitu FFPE direndam secara berurutan dalam larutan alkohol dengan konsentrasi yang menurun (terbalik dari dehidrasi), mulai dari 100%, 95% dan 70%, masing-masing selama 2 menit.
- c. Setelah itu slide direndam dalam air suling selama 5 menit.

Selain dengan menggunakan xylene, terdapat alternatif lain deparafinisasi dengan menggunakan metode *Projected Hot Air Deparaffinization* (PHAD), merupakan alternatif sederhana berbasis panas untuk menghilangkan parafin dari potongan jaringan histologi. Metode ini memberikan keuntungan tambahan karena menghindari penggunaan pelarut organik seperti xylene, yang dapat merusak struktur jaringan atau memengaruhi hasil pewarnaan tertentu, dan menunjukkan hasil yang baik untuk pewarnaan rutin Hematoxylin and Eosin (H&E), bahkan menghasilkan hasil pewarnaan yang lebih baik untuk pewarnaan acid-fast stains (AFS) seperti auramine O yang digunakan untuk mendeteksi *Mycobacteria*. Metode ini

menggunakan pengering rambut (*hair dryer*) sebagai sumber udara panas. Prosesnya adalah (Marinho & Hanscheid, 2023):

- a. Siapkan pengering rambut.
- b. Letakkan kaca preparat dengan jaringan FFPE pada reservoir yang miring sekitar 45° untuk memudahkan parafin yang meleleh mengalir keluar.
- c. Nyalakan pengering rambut pada pengaturan suhu dan kecepatan maksimum.
- d. Arahkan udara panas ke kaca preparat selama 20 menit. Suhu rata-rata yang dihasilkan adalah sekitar 72,5°C, cukup untuk melelehkan parafin.
- e. Kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi dengan mencelupkan ke kaca preparat dengan jaringan FFPE ke dalam reservoir berisi air suling selama 5 menit untuk rehidrasi jaringan dan mengeraskan sisa parafin di luar jaringan.

Setelah tahap deparafinisasi dan rehidrasi, proses pembuatan preparat histokimia selesai, dan siap untuk dilanjutkan dengan tahap pewarnaan sesuai dengan kebutuhan pemeriksaan jaringan

## DAFTAR PUSTAKA

- Bhat, A. H., & Hussein, S. (2021). Fixation and different types of fixatives: Their role and functions: A review. *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology*, 4(4), 113–119. <https://doi.org/10.33545/pathol.2021.v4.i4b.433>
- Golberg, M., Kobos, J., Clarke, E., Bajaka, A., Smędra, A., Balawender, K., Wawrzyniak, A., Seneczko, M., Orkisz, S., & Żytkowski, A. (2024). Application of histochemical stains in anatomical research: A brief overview of the methods. In *Translational Research in Anatomy* (Vol. 35). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.tria.2024.100294>
- Hart, J. S., Adheke, O. M., & Onyenaucheya, C. (2025). Histochemistry: Understanding its Principles, Techniques, and their Applications. *Asian Journal of Medical Principles and Clinical Practice*, 8(1), 163–175. <https://doi.org/10.9734/ajmpcp/2025/v8i1279>
- Marinho, P. F., & Hanscheid, T. (2023). A simple heat-based alternative method for deparaffinization of histological sections significantly improves acid-fast staining results for Mycobacteria in tissue. *MethodsX*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2023.102079>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's Basic Histology : Text and Atlas* (15th ed.). McGraw Hill Education.

# BAB 6

## PRINSIP DASAR IMUNOHISTOKIMIA: REAKSI ANTIGEN-ANTIBODI

Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA.

### A. Pendahuluan

Imunohistokimia (IHK) adalah teknik laboratorium yang menggabungkan prinsip imunologi, histologi, dan kimia untuk mendeteksi antigen (Ag) spesifik di dalam sel dan jaringan dengan menggunakan antibodi (Ab) yang sesuai. Teknik ini memungkinkan identifikasi visual Ag tertentu pada sel atau jaringan yang diwarnai secara spesifik oleh Ab berlabel. Pemeriksaan IHK sangat berguna dalam diagnosis patologis, penelitian biomedis, terapi target dan analisis prognostik (Magaki et al., 2019; Nurcahyanti & Kusmardi, 2024).

Fitur unik yang membuat IHK menonjol di antara banyak tes laboratorium lainnya adalah bahwa hal itu dilakukan tanpa merusak arsitektur histologis. Dengan demikian, penilaian ekspresi pola molekul dimungkinkan dalam konteks lingkungan mikro. Analisis bersama molekul target dan hubungan subseluler, seluler, dan antar sel. Kepentingan analisis bersama ini semakin diakui dalam bidang penelitian biomedis seperti pengembangan obat baru dan penyelidikan biomarker prognostik/prediktif (Kim et al., 2016).

### B. Sejarah Imunohistokimia

Alat dasar IHK yang kita gunakan saat ini dibuat lebih dari 100 tahun yang lalu ketika von Behring menemukan Ab serum yang diberi nama 'antitoksin' pada tahun 1890 dan

menggunakannya untuk menyembuhkan difteri dan tetanus. Namun, sedikit yang diketahui tentang kimiawinya hingga tahun 1941, ketika Ab terkonjugasi pertama kali digunakan. Faktanya, Coons dan Fieser menggunakan teknik imunofluoresen untuk pertama kalinya, pewarnaan Ag pneumokokus menggunakan *fluorescein-5-isothiocyanate* (FITC) - Ab terkonjugasi melalui mikroskop yang dilengkapi dengan sinar ultraviolet (UV). Para peneliti mencari konjugasi Ab alternatif karena fluoresensi yang lemah dari mikroskop fluoresen pertama (Hassani & Cocco, 2024).

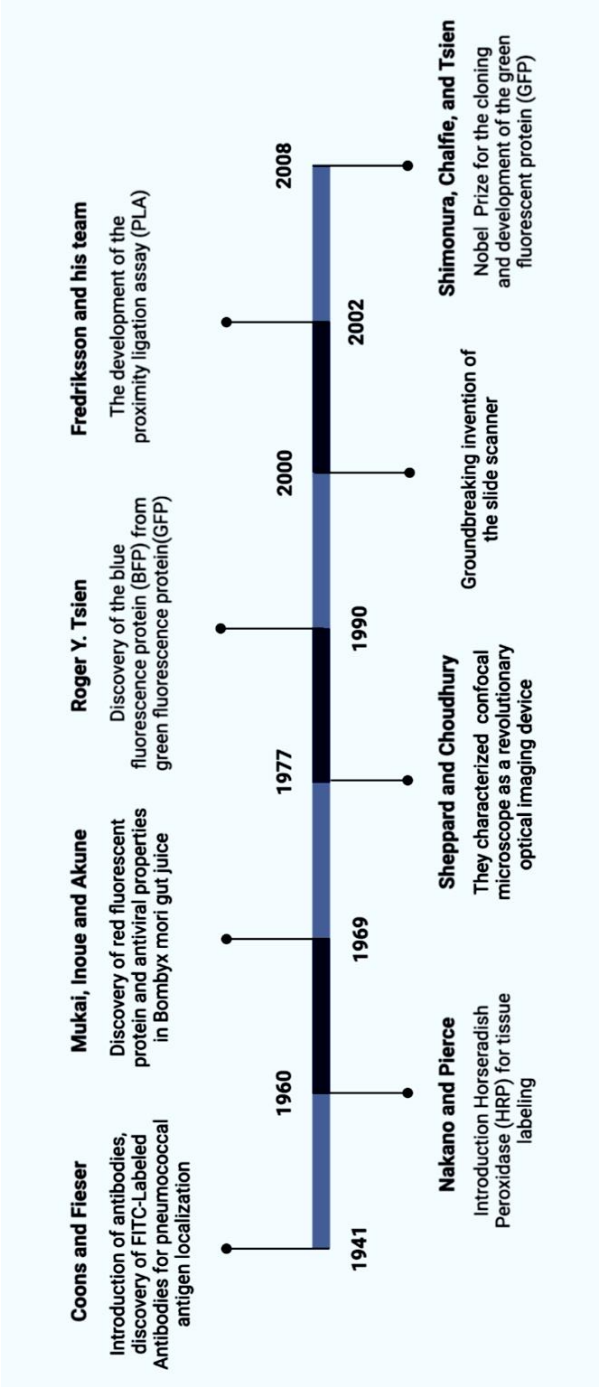
*Horse-dish peroxidase* (HRP), enzim yang mengoksidasi substrat *3,3'-diaminobenzidin*, ditemukan oleh Nakano dan Pierce pada tahun 1960-an. Kompleks *peroksidase-anti-peroksidase* kemudian ditemukan untuk meningkatkan sinyal Ab. Karena enzim ini menghasilkan warna yang terlihat di bawah mikroskop cahaya optik standar (yang telah ada sejak abad ke-16), penggunaannya yang mudah membuat cocok untuk pengaturan klinis dan penelitian. Namun, pada tahun 1960-an, sinyal fluoresensi diperkuat dengan diperkenalkannya cermin dikroik. Shimomura pada tahun yang sama mengidentifikasi protein molekul yang memancarkan cahaya bernama *green fluorescent protein* (GFP). Mukai, Inoue dan Akune pertama kali mendokumentasikan pada tahun 1969 keberadaan *red fluorescent protein*. Kemudian, pada tahun 1990-an, *blue fluorescent protein* (BFP) ditemukan oleh Roger Y. Tsien dan kolaboratornya. Sementara, selama tahun 2000-an, GFP dikloning oleh Shimomura, Chalfie, dan Tsien sehingga mendapatkan hadiah Nobel (Hassani & Cocco, 2024).

Penggunaan fluorokrom gabungan menawarkan berbagai keuntungan, seperti pencitraan kontras tinggi dari beberapa komponen dalam satu sel. Namun demikian, fluorokrom yang kehilangan fluoresensi ketika terpapar cahaya adalah salah satu kelemahan dalam penggunaannya. *Proximity ligation assay* (PLA) yang dimulai pada tahun 2002 oleh Fredriksson adalah penemuan terbaru di bidang konjugasi Ab. Ini memberikan keuntungan dibandingkan imunofluoresen tradisional dengan

memeriksa lokalisasi subseluler protein individu dan interaksi protein-protein. Teknik ini menggunakan dua Ab primer, masing-masing yang mampu mengenali protein Ag yang sama. Antibodi sekunder yang diarahkan pada daerah konstan dari Ab primer terhubung ke untai DNA pendek yang dinamakan probe PLA. Untaian DNA dapat terlibat dalam sintesis DNA lingkaran bergulir jika probe PLA berdekatan (maksimum 40 nm). *Probe* oligonukleotida berlabel fluoresen kemudian ditambahkan untuk mengikat DNA lingkaran (Hassani & Cocco, 2024).

Bersamaan dengan perkembangan konjugasi Ab, mikroskop cahaya juga meningkat secara signifikan. Bahkan, pada tahun 1977, Sheppard dan Choudhury menciptakan istilah 'mikroskop konfokal'. Mikroskop ini memungkinkan untuk merekonstruksi struktur tiga dimensi sekaligus menghilangkan cahaya yang tidak fokus dengan mengambil beberapa gambar dua dimensi pada berbagai kedalaman. Mikroskop ini telah mendapatkan kegunaan dalam analisis jaringan, sel dan interaksi yang rumit dalam struktur biologis menggunakan Ab yang terkonjugasi dengan enzim atau fluorokrom. Namun, keterbatasannya adalah kecepatan yang relatif lambat saat memperoleh gambar dan kisaran kecil dari panjang gelombang eksitasi yang tersedia. Keterbatasan lain termasuk fototoksitas dari proses pemindaian, yang mungkin tidak menguntungkan untuk pencitraan sel hidup (Hassani & Cocco, 2024).

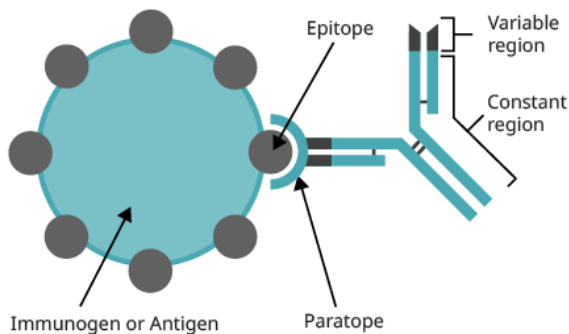
Teknologi pemindai slaid dengan gambar resolusi tinggi pada tahun 2000-an memungkinkan untuk membuat dan berbagi gambar digital. Gambar yang diperoleh dari pewarnaan Ab yang dikonjugasikan dengan enzim atau fluorokrom, memungkinkan pemeriksaan jarak jauh, diagnosis, dan pengarsipan segera. Namun, salah satu kekurangannya adalah sulit untuk fokus pada area dimana banyak data direkam. Sejarah perkembangan IHK secara ringkas dapat dilihat dibawah ini (Gambar 6.1) (Hassani & Cocco, 2024).



Gambar 6.1 Sejarah Perkembangan IHK.

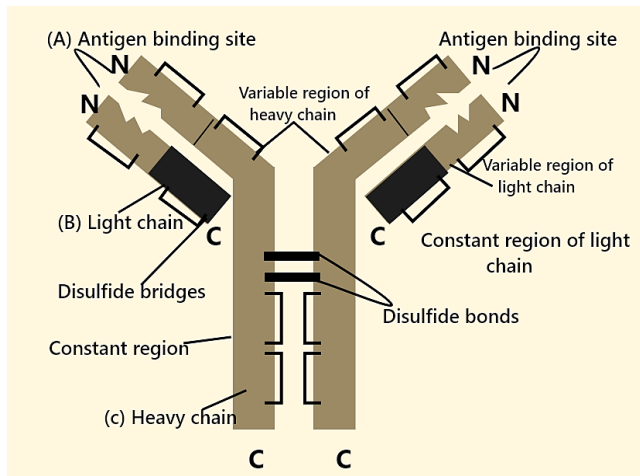
### C. Konsep Reaksi Antigen-Antibodi

Prinsip utama IHK merupakan reaksi Ag-Ab. Proses pemeriksaan melalui ikatan Ab spesifik terhadap Ag target dalam sel atau jaringan. Antigen mengandung epitop, yaitu situs penentu Ag yang dikenali secara spesifik oleh Ab. Sementara Ab atau imunoglobulin (Ig) dihasilkan oleh sel plasma dan memiliki struktur berbentuk “Y” dengan dua situs pengikatan antigen di ujungnya yaitu paratop (Gambar 6.2). Interaksi Ag-Ab melibatkan kecocokan bentuk muatan, sehingga Ab dapat mengikat Ag dengan sangat spesifik dan kuat (Nurchayanti & Kusmardi, 2024).



**Gambar 6.2** Struktur Antigen

Imunoglobulin (Ig) yang paling umum digunakan dalam IHK adalah IgG, sedangkan IgM lebih jarang digunakan. Struktur Ab berbentuk “Y”, terdiri dari dua rantai berat (*heavy chains*) yang lebih panjang dan dua rantai ringan (*light chains*) dan dihubungkan oleh ikatan disulfida. Antibodi memiliki area fungsional yaitu area variabel yang terletak di ujung lengan “Y” dan area konstan di batang serta sebagian lengan “Y”. Area variabel berisi domain pengikatan Ag (Fab) yang sangat bervariasi dalam urutan asam aminonya. Area variabel berfungsi mengikat epitop yang merupakan bagian spesifik pada Ag. Ekor “Y” pada rantai berat disebut Fc. Sementara area konstan memediasi interaksi dengan reseptor sel imun dan komponen sistem imunitas lain seperti makrofag dan *natural killer cells* (Gambar 6.3) (Ramos-Vara, 2005).



**Gambar 6.3** Struktur Antibodi

Rantai ringan pada sebagian besar vertebrata memiliki dua bentuk yang berbeda, yang disebut kappa dan lambda. Dalam molekul Ig apa pun, kedua rantai ringan dan kedua rantai berat memiliki tipe yang sama. Rantai ringan terdiri dari dua daerah yang berbeda: setengah terminal C dari rantai konstan dan disebut CL (constant: *light chains*), sedangkan setengah terminal N dari rantai memiliki variabilitas urutan yang melimpah, disebut daerah VL (variabel: *heavy chains*). Domain Fab adalah bagian pengikat Ag dan mengandung area variabel dan konstan dari rantai berat dan ringan. Area yang menghubungkan daerah Fab dan area konstan adalah area engsel (*hinge region*) yang bersifat fleksibel sehingga memungkinkan Ab untuk mengikat antigen pada jarak yang bervariasi dan membantu pembentukan kompleks. Domain pengikatan Ag (Fab) menentukan spesifisitas Ag serta fragmen Fc yang berperan dalam aktivitas biologis lain (Ramos-Vara, 2005).

Domain Fc diperlukan untuk teknik IHK *multistep*. Bagian ini juga bertanggung jawab atas pewarnaan latar belakang yang dihasilkan dari ikatan non imun Ab ke bagian jaringan. Untuk menghindari itu, maka hanya menggunakan bagian Fab2 dari molekul Ab untuk IHK. Masalah utama dengan pendekatan ini

adalah bagian Fc cenderung menstabilkan pengikatan Ab ke substrat padat seperti jaringan. Pengikatan spesifik dari Ab ke Ag melalui daerah hipervariabel dari rantai berat dan rantai ringan dari ujung amino yaitu paratop pada Ag dan epitop pada Ab (Ramos-Vara, 2005).

Epitop biasanya memiliki panjang 5-21 asam amino. Salah satu kriteria paling penting untuk pengikatan Ab adalah struktur tersier epitop, atau cara dimana rantai peptida suatu protein dilipat bersama atau berinteraksi dengan peptida yang berdekatan. Paratop berinteraksi dengan struktur tersier epitop melalui serangkaian interaksi ikatan non kovalen. Semakin banyak interaksi ikatan, semakin besar afinitas dan aviditas (didefinisikan sebagai kekuatan pengikatan secara keseluruhan antara Ag-Ab) dari Ab. Antibodi spesifik IgG bersifat bivalen (memiliki dua lengan identik yang digunakan dalam pengenalan Ag). Ini adalah fitur utama yang diperlukan untuk melakukan metode IHK berlapis-lapis (Ramos-Vara, 2005).

#### **D. Mekanisme Reaksi Antigen – Antibodi dalam Imunohistokimia**

Dari sudut pandang kimia dan biokimia, interaksi antara Ag-Ab agak tidak biasa. Ikatan yang terlibat adalah ikatan yang lemah (sebagian besar hidrofobik dan elektrostatis) dan bukan kovalen. Ikatan hidrofobik terjadi antara makromolekul dengan tegangan permukaan yang lebih rendah daripada air. Ikatan ini dapat berupa ikatan antar atom atau antarmolekul. Interaksi hidrofobik ini diberikan terutama melalui asam amino rantai samping fenilalanin, tirosin, dan triptofan. Daya tariknya lebih rendah terhadap molekul air, sehingga asam amino ini cenderung untuk terhubung satu sama lain. Interaksi elektrostatis (Coulomb) disebabkan oleh gaya tarik-menarik antara satu atau lebih banyak sisi terionisasi dari penentu Ag dan ion bermuatan berlawanan pada situs aktif Ab. Ini biasanya adalah gugus karboksil dan gugus amino dari asam amino polar dari molekul Ag dan Ab. Gaya van der Waals adalah interaksi

elektrostatik yang lemah antara molekul atau atom dipolar (Ramos-Vara, 2005).

Gaya van der Waals dan tarikan elektrostatik maksimal pada jarak terpendek. Oleh karena itu, penjajaran yang tepat dari ion bermuatan berlawanan pada epitop dan paratop mendukung ikatan elektrostatik yang kuat. Ikatan hidrogen adalah hasil interaksi difusi antara OH dan CO, NH dan CO, serta gugus NH dan OH. Energi pengikatan memiliki urutan yang sama besarnya dengan energi van der Waals dan interaksi elektrostatik. Signifikansi dalam interaksi Ag-Ab mungkin tidak terlalu besar karena perlunya kecocokan yang sangat tepat antara kedua molekul agar hal itu terjadi. Meskipun ada kasus di mana hanya satu dari jenis interaksi ini yang signifikan dalam pengikatan Ag-Ab, untuk sebagian besar polisakarida, glikoprotein, dan polipeptida Ag, ikatan Ag-Ab merupakan kombinasi dari gaya van der Waals dan interaksi elektrostatik. Antibodi adalah divalen, sebagian besar protein Ag bersifat multivalen. Setiap situs valensi protein Ag umumnya adalah penentu antigenik (epitop) dengan konfigurasi yang sepenuhnya berbeda dari semua situs valensi lainnya (misalnya, Ab monoklonal dapat bereaksi hanya dengan satu situs valensi dari protein Ag tersebut) (Ramos-Vara, 2005).

Reaksi Ag-Ab dalam IHK biasanya terjadi secara umum antara dua makromolekul protein: Ag dapat berupa glikoprotein, lipoprotein, atau hanya protein, dan Ab yang merupakan glikoprotein. Namun, harus ditekankan bahwa dalam kasus ini salah satu makromolekul, Ag terletak di bagian jaringan yang diawetkan dengan formalin dan tertanam parafin. Jelas protein Ag tidak dapat bergerak, dan sedikit banyak diubah dalam konstitusi dan konformasinya, di bagian jaringan. Namun, menurut temuan Mason dan O'Leary (1991), setidaknya, struktur sekunder protein telah "terkunci" dalam proses fiksasi (Montero, 2003).

Makromolekul Ab yang diencerkan dalam buffer yang menutupi bagian jaringan bebas, selama masa inkubasi, untuk mengembara di dalam buffer tersebut, mematuhi hukum

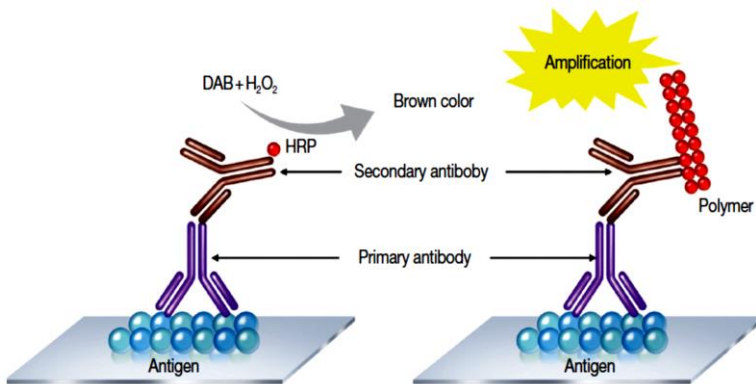
kinetika Brown. Tentu saja, hasil akhir harus merupakan konsekuensi dari berbagai faktor yang mengintervensi dalam kinetika ini, misalnya pH, konsentrasi, penyangga konstituen, garam yang ditambahkan, pengenceran yang digunakan, dan suhu. Salah satu parameter yang paling penting adalah pH karena titik isoelektrik IgG yang digunakan dalam prosedur ini berada dalam kisaran pH antara 6,5-8,5 dan “imunoreaktivitas optimal antibodi monoklonal homogen dapat dikompromikan jika pH ... buffer pengencer membuat muatan elektrostatis dari epitop atau paratop menjadi identik ...” (Montero, 2003).

Sedangkan konformasi protein Ig yang digunakan dalam reaksi Ag-Ab dalam jaringan terawetkan dengan baik, biasanya dalam bentuk aslinya. Konformasi protein Ag yang terletak di jaringan, tidak dapat dianggap utuh. Ini telah mengalami efek dari fiksatif formaldehida dan mungkin telah dimodifikasi dalam konstitusi atau konformasinya. Menurut Mason dan O’Leary (1991), “struktur sekunder protein asli dalam jaringan yang difiksasi formaldehida telah dikunci secara efektif oleh proses fiksasi”. Fiksasi formaldehid rutin dan sisa prosedur untuk penanaman parafin mungkin telah mengubah makromolekul protein, akibatnya mengurangi intensitas reaksi akhir dalam prosedur IHK (Montero, 2003).

Kinetika dua makromolekul seperti Ag dan Ab, yang keduanya bebas bergerak dalam cairan pengenceran, tidak memiliki kemiripan apapun dengan kinetika dua makromolekul yang bekerja dalam IHK. Dalam hal ini, salah satunya “berlabuh” di bagian jaringan, agak diubah oleh aksi fiksatif, dan terikat pada banyak makromolekul lain dengan cara yang tidak dipahami dengan jelas. Yang lain berada dalam keadaan aslinya dan bebas bergerak dalam buffer pengenceran. Tentu saja, hukum dasar fisika dan kimia selalu sama: daya tarik elektrovalen pada jarak tertentu antara makromolekul dan gaya van der Waals, pembentukan ikatan hidrogen dan adhesi hidrofobik ketika jaraknya lebih kecil. Namun, keadaan tidak bergerak dari antigen ditambah perubahan yang telah terjadi pada gugus samping proteinnya merupakan faktor yang

mungkin telah memodifikasi dan mengkondisikan pengikatan. Kemungkinan asosiasinya dengan protein atau makromolekul lain di lingkungan dapat menjadi penghalang pengikatannya pada Ab (Montero, 2003).

Reaksi Ag-Ab mengikuti hukum aksi massa yang dapat dibalik. Mekanisme reaksi Ag-Ab berupa: Ab akan mengikat Ag pada jaringan target membentuk kompleks Ag-Ab. Kompleks Ag-Ab selanjutnya akan dideteksi dengan sistem label, baik berupa enzim (seperti *peroksidase*) yang menghasilkan reaksi warna atau fluorokrom untuk fluoresensi. Warna atau sinyal yang dihasilkan menunjukkan lokasi Ag dalam jaringan sehingga dapat diamati dengan mikroskop (Gambar 6.4).



**Gambar 6.4** Reaksi Antigen-Antibodi Pewarnaan Imunohistokimia

Ringkasnya, faktor-faktor yang mempengaruhi kekuatan dan spesifitas reaksi Ag-Ab dalam IHK sebagai berikut: (a) kecocokan bentuk dan kimia (muatan) antara Ag dan Ab; (b) konsentrasi Ag dan Ab pada preparat; (c) metode dan kualitas Ab yang digunakan; (d) keadaan fiksasi antigen di bagian jaringan, dengan adanya jembatan kimia yang mengikat sisi reaktif kelompok protein; (e) kebebasan relatif dari makromolekul Ab yang bebas bergerak dalam pengenceran buffer yang menutupi bagian tersebut; (f) pH buffer yang digunakan untuk pengenceran antibodi primer, kisaran pH terbaik untuk reaksi IgG dalam prosedur IHK adalah 6,5 sampai

8,5; dan (g) suhu dan kekuatan ionik medium reaksi (Montero, 2003).

#### E. Pemilihan Antibodi

Antibodi dihasilkan dengan mengimunitasi hewan (tikus, kelinci, kambing, kuda, dan lain-lain) menggunakan Ag yang dimurnikan. Hewan tersebut memberikan respon dengan memproduksi Ab yang secara spesifik mengenali dan mengikat Ag tersebut. Ada dua jenis Ab primer yang umum dalam IHK, yaitu Ab monoklonal dan poliklonal. Antibodi monoklonal diproduksi utama pada tikus. Köhler dan Milstein mengembangkan teknologi produksi Ab monoklonal. Tikus disuntik dengan imunogen yang dimurnikan (Ag). Setelah respons imun tercapai, sel limfosit B (sel penghasil antibodi) dipanen dari limpa. Karena sel B yang diisolasi memiliki usia simpan terbatas, mereka digabungkan dengan sel mieloma tikus. Hal ini diikuti dengan seleksi hibridoma dengan spesifisitas yang diinginkan. Sel hibrid yang dihasilkan (hibridoma) adalah sel abadi yang memproduksi Ig spesifik untuk satu epitop Ag tertentu. Sementara Ab poliklonal dihasilkan dari berbagai klon sel B yang dapat mengenali beberapa epitop dari Ag yang sama (Ramos-Vara, 2005; Magaki et al., 2019).

Keunggulan Ab monoklonal adalah spesifisitasnya yang lebih tinggi dibandingkan dengan Ab poliklonal. Hibridoma dapat dipertahankan dalam kultur sel (Ab yang sangat murni tetapi dengan konsentrasi rendah) atau dalam peritoneum tikus (cairan asites, yang memiliki konsentrasi antibodi 10-100 kali lebih tinggi daripada dalam kultur sel tetapi mengandung protein non spesifik dan Ig endogen dari tikus). Spesifisitas ini mengurangi (meskipun tidak menghilangkan sepenuhnya) kemungkinan reaktivitas silang dengan Ag lain. Salah satu alasan reaktivitas silang adalah Ab monoklonal menargetkan epitop yang terdiri dari sejumlah kecil asam amino, yang dapat menjadi bagian dari beberapa jenis protein dan *peptide* (Ramos-Vara, 2005).

Sebagai contoh, Ab anti-proinsulin manusia bereaksi silang dengan sel-sel penghasil insulin dan glukagon. Karakteristik pewarnaan hampir atau sepenuhnya identik dengan epitop Ag yang dituju karena ikatan ini terjadi pada epitop yang identik, sehingga sangat sulit untuk dibedakan. Dalam beberapa kasus, sulit untuk menentukan apakah reaktivitas imunologis disebabkan oleh epitop yang sama (reaksi silang) atau epitop yang terbentuk akibat pengikatan silang protein selama fiksasi dengan aldehida. Pewarnaan latar belakang Ab monoklonal karena Ig non spesifik berkurang (cairan asites) atau tidak ada (supernatant kultur sel). Antibodi monoklonal kelinci juga tersedia secara komersial. Produksinya telah dipermudah oleh pengembangan pusat Ab. Keuntungan Ab monoklonal kelinci dibandingkan Ab monoklonal tikus adalah afinitas yang lebih tinggi, kesesuaian untuk digunakan pada jaringan tikus tanpa prosedur khusus, spesifisitas yang lebih tinggi dalam beberapa kasus (Ramos-Vara, 2005).

Antibodi monoklonal memberikan keunggulan berupa ketepatan dan konsistensi. Hal ini akan menghasilkan sinyal yang lebih kuat tetapi kurang spesifik. Antibodi poliklonal memiliki afinitas yang lebih tinggi dan reaktivitas yang luas, tetapi spesifisitas yang lebih rendah dibandingkan dengan Ab monoklonal. Antibodi poliklonal memiliki keunggulan dibandingkan Ab monoklonal karena lebih mungkin mengidentifikasi beberapa isoform (epitop) protein target. "Promiskuitas imunologis" antibodi poliklonal yang dapat menjadi keuntungan (misalnya, lebih banyak kemungkinan mendeteksi Ag melalui pengenalan epitop yang beragam) juga dapat menjadi kelemahan. Semakin banyak jumlah Ab poliklonal yaitu antibodi terhadap protein target dalam satu preparat, semakin besar kemungkinan reaktivitas silang dengan epitop serupa pada protein lain. Oleh karena itu kemungkinan hasil positif palsu semakin besar (Ramos-Vara, 2005).

## **F. Simpulan**

Pemeriksaan IHK sangat diperlukan saat ini dalam praktik sehari-hari dan penelitian dasar untuk menjelaskan patofisiologi penyakit. Selain itu, pemeriksaan IHK sangat diperlukan untuk validasi dalam penemuan biomarker yang pada akhirnya akan mengarah pada terapi target. Bab ini memberikan gambaran menyeluruh mengenai prinsip dasar reaksi Ag-Ab dalam IHK, mulai molekul Ag dan Ab, pemilihan Ab, serta interaksi spesifik keduanya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Hassani, M. El, & Cocco, C. (2024). A Beginner ' s Guide to Immunohistochemistry. *The Biochemist*, 0(May), 18–22. <https://doi.org/10.1042/BIO20200034>
- Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50(6), 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 289–298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
- Montero, C. (2003). The Antigen - Antibody Reaction in Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 51(1), 1–4.
- Nurcahyanti, O., & Kusmardi, K. (2024). Pratista Patologi Imunohistokimia pada Kanker Payudara : Teknik , Aplikasi , dan Implikasinya dalam Diagnostik dan Terapi. *Pratista Patologi*, 9(2), 185–197.
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

# BAB 7

## SISTEM DETEKSI KEBERADAAN ANTIGEN

dr. Fadhil Kurniawan

### A. Pendahuluan

Sistem deteksi antigen merupakan kerangka penting dalam imunohistokimia (IHC), yang memungkinkan visualisasi ikatan antibodi primer dengan epitop target melalui konversi sinyal imunologis menjadi output yang dapat terdeteksi. Sistem ini berperan vital dalam menentukan sensitivitas yang mengacu pada batas deteksi antigen dan spesifisitas, yaitu selektivitas ikatan antibodi selama analisis jaringan. Perkembangan terbaru di bidang ini semakin berfokus pada strategi amplifikasi sinyal untuk meningkatkan deteksi antigen dengan ekspresi rendah pada sampel *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE), sehingga menegaskan pentingnya metode deteksi yang presisi (Pham *et al.*, 2021; Mei *et al.*, 2022)

Integrasi yang berhasil antara sistem deteksi dengan metode pemrosesan jaringan—termasuk fiksasi, embedding, dan antigen retrieval secara signifikan memengaruhi akurasi diagnostik. Pemahaman mendalam mengenai parameter teknis ini sangat penting untuk meningkatkan hasil deteksi dalam praktik klinis (Kumar *et al.*, 2023). Bukti dari studi terbaru menunjukkan bahwa sistem polimer canggih memiliki potensi untuk meningkatkan sensitivitas deteksi, khususnya dalam aplikasi diagnostik kanker stadium awal (Flory *et al.*, 2023). Hal ini menekankan peran krusial dari metode deteksi inovatif dalam meningkatkan keandalan dan efektivitas diagnostik

kanker melalui peningkatan sensitivitas dan spesifisitas, yang merupakan dasar untuk karakterisasi penyakit yang akurat dan pengambilan keputusan terapeutik selanjutnya (Cascone *et al.*, 2022).

Seiring dengan terus disempurnakannya platform deteksi ini, penting untuk berfokus tidak hanya pada kemajuan teknis tetapi juga pada faktor biologis yang dapat memengaruhi hasil diagnostik. Hubungan antara spesifisitas antibodi, amplifikasi sinyal, dan teknik pemrosesan jaringan menjanjikan peningkatan yang signifikan dalam akurasi diagnostik pada evaluasi patologis (Mei *et al.*, 2022).

## **B. Klasifikasi Sistem Deteksi Antigen**

### **1. Klasifikasi Mekanistik**

Klasifikasi sistem deteksi antigen dalam imunohistokimia (IHC) dapat dibagi menjadi tiga pendekatan utama, yaitu deteksi enzimatik, deteksi fluoresensi, dan deteksi berbasis nanopartikel logam.

#### **a. Deteksi Enzimatik**

Sistem deteksi enzimatik merupakan fondasi utama dalam imunohistokimia (IHC). Teknologi ini memanfaatkan konjugasi enzim-antibodi untuk mengonversi substrat menjadi produk kromogenik yang dapat diamati secara visual. Sistem ini banyak digunakan dalam diagnostik histopatologi rutin karena hasil pewarnaannya yang stabil serta kompatibilitasnya dengan sampel *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) (RASHIDOVA, Say and Ersöz, 2025).

Mekanisme kerja sistem deteksi enzimatik berlangsung melalui tiga tahap. Pertama, antibodi sekunder yang terkonjugasi enzim, seperti horseradish peroxidase (HRP) atau alkaline phosphatase (AP), berikatan secara spesifik dengan daerah Fc pada antibodi primer. Kedua, substrat yang sesuai ditambahkan, misalnya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk HRP atau BCIP/NBT untuk AP. Ketiga, enzim yang terikat mengkatalisis substrat

sehingga menghasilkan endapan kromogenik *in situ*, yang menampilkan keberadaan antigen target secara jelas di bawah mikroskop (Fan *et al.*, 2023).

HRP, dengan berat molekul sekitar 44 kDa, bekerja optimal pada rentang pH 5,0–6,0 melalui siklus redoks  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$  dengan  $\text{H}_2\text{O}_2$  sebagai kofaktor. Meski efektif, HRP cukup rentan terhadap inhibisi oleh senyawa seperti mioglobin pada jaringan otot, serta dapat terganggu oleh aktivitas peroksidase endogen pada eritrosit (Nesa *et al.*, 2025). Sebaliknya, AP berbentuk dimer dengan berat molekul sekitar 140 kDa dan berfungsi paling optimal pada pH 8,0–9,5. Enzim ini membutuhkan dua ion seng pada situs aktifnya untuk menghidrolisis ester fosfat. AP relatif lebih stabil dalam kondisi alkali, namun dapat dihambat oleh senyawa seperti levamisole (Hena *et al.*, 2024).

Selain enzim, substrat dan kromogen memiliki peran penting dalam menentukan hasil visual dari sistem deteksi enzimatik. Substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine) merupakan standar emas dalam diagnostik karena mampu dioksidasi oleh HRP dengan bantuan  $\text{H}_2\text{O}_2$  sehingga menghasilkan endapan polimer coklat yang stabil ( $\lambda_{\text{max}}$  450 nm). Reaksi ini bersifat irreversibel, tahan terhadap pelarut organik, dan dapat bertahan lebih dari satu tahun, sehingga sangat sesuai untuk kebutuhan arsip patologi (Fan *et al.*, 2023). Substrat lain seperti Fast Red dihidrolisis oleh AP melalui mekanisme azo-kopling, menghasilkan fluorofor merah ( $\lambda_{\text{max}}$  570 nm). Namun, substrat ini memiliki kelemahan berupa fotostabilitas yang rendah, biasanya hanya bertahan beberapa minggu, sehingga lebih cocok untuk aplikasi mounting berbasis akuosus. Alternatif lainnya adalah Vector® VIP, yang menghasilkan endapan ungu ( $\lambda_{\text{max}}$  550 nm) dengan tingkat stabilitas menengah, sekitar enam bulan, dan sering digunakan dalam diferensiasi jaringan (Fan *et al.*, 2023).

Kinerja sistem deteksi enzimatik ditentukan oleh beberapa parameter kritis. Dari sisi stabilitas, DAB unggul karena dapat bertahan dalam jangka waktu lama, sementara Fast Red relatif kurang stabil. Dari segi sensitivitas, substrat BCIP/NBT yang digunakan bersama AP mampu mencapai limit of detection (LOD) hingga 0,3 ng/mm<sup>2</sup>, lebih sensitif dibandingkan DAB yang memiliki LOD 0,5 ng/mm<sup>2</sup> (Hena *et al.*, 2024). Namun, aspek toksisitas juga harus diperhatikan karena DAB dikenal bersifat karsinogenik sehingga memerlukan penanganan sesuai standar biosafety level 2 (BSL-2). Sebaliknya, Fast Red relatif lebih aman (Huang *et al.*, 2022). Dari segi kompatibilitas, DAB lebih unggul karena tahan terhadap xilena dan etanol, menjadikannya sangat sesuai untuk sampel FFPE. Sebaliknya, Fast Red larut dalam pelarut organik sehingga memerlukan mounting berbasis akuosus (Giaretta *et al.*, 2021).

Sistem deteksi enzimatik juga menghadapi tantangan signifikan, termasuk interferensi dari enzim endogen seperti mieloperoksidase pada jaringan otot dan aktivitas peroksidase endogen dalam eritrosit, yang dapat mempersulit deteksi yang akurat (Fanelli *et al.*, 2023). Aktivitas HRP dapat dihambat oleh mioglobin, sementara toksisitas DAB menuntut prosedur keamanan ketat (Huang *et al.*, 2022; Nesa *et al.*, 2025). Batasan lainnya adalah rendahnya kemampuan multiplexing, di mana sistem enzimatik umumnya hanya mampu mendeteksi dua hingga tiga target secara simultan, jauh tertinggal dibandingkan sistem fluoresensi (Tansini *et al.*, 2020).

Kemajuan terbaru berfokus pada peningkatan sensitivitas sistem deteksi ini, terutama untuk antigen dengan tingkat ekspresi rendah pada sampel FFPE. Berbagai studi telah menyoroti efektivitas strategi optimasi, termasuk integrasi sistem amplifikasi berbasis polimer yang dapat meningkatkan sensitivitas deteksi melebihi sistem tradisional avidin-biotin (Mueller *et al.*,

2020; Moser *et al.*, 2021). Seiring dengan terus berkembangnya sensitivitas dan spesifisitas deteksi, pemahaman mendalam mengenai mekanisme sistem deteksi berbasis enzim tetap krusial untuk meningkatkan akurasi diagnostik dalam praktik klinis (Velasco-Vales *et al.*, 2021).



**Gambar 7.1** IHC Deteksi Enzimatis (HRP-DAB)

**b. Deteksi Fluoresensi**

Sistem deteksi fluoresensi memanfaatkan prinsip fotofisika untuk memfasilitasi visualisasi target molekuler dalam sampel biologis. Sistem ini menggunakan fluorofor yang menyerap foton berenergi tinggi ( $\lambda_{ex}$ ) dan memancarkan foton berenergi lebih rendah ( $\lambda_{em}$ ) ketika kembali ke keadaan dasar. Efisiensi proses fluoresensi ini terutama ditentukan oleh kuantum yield ( $\Phi_F$ ) dan koefisien ekstingsi molar, dengan fluorofor seperti Alexa Fluor® 647 ( $\Phi_F = 0,94$ ,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 650/665$  nm) yang menonjol karena fotostabilitasnya yang tinggi (Kang *et al.*, 2022).

Efikasi operasional sistem ini ditingkatkan secara signifikan oleh sistem amplifikasi berbasis afinitas streptavidin-biotin ( $KD = 10^{-15}$  M), yang berkontribusi pada sensitivitas luar biasa, dengan limit of detection

(LOD) hanya 0,05 ng/mm<sup>2</sup>. Selain itu, sistem ini mampu melakukan deteksi multiplex lebih dari 40 penanda secara simultan, dengan resolusi spasial setinggi 180 nm melalui teknik super-resolusi seperti *Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy* (Banala *et al.*, 2022).

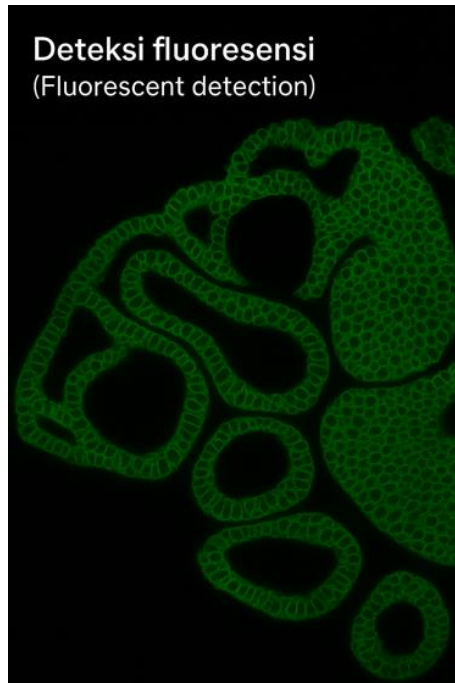
Salah satu aplikasi inovatif dari deteksi fluoresensi adalah protokol CODEX®, yang mengkonjugasi antibodi dengan oligonukleotida. Hal ini memungkinkan hibridisasi sekuensial probe fluorofor dan menghasilkan resolusi subseluler (Li and Smith, 2021). Pencitraan fluoresensi telah muncul sebagai alat yang kuat untuk mempelajari heterogenitas biomarker, khususnya pada jaringan kompleks seperti kanker payudara (Cheung *et al.*, 2021).

Kemajuan terbaru dalam deteksi fluoresensi mencakup pengembangan quantum dots (Qdots), yang memiliki spektrum emisi sempit dan menunjukkan ketahanan yang jauh lebih tinggi terhadap photobleaching dibanding fluorofor konvensional, sehingga meningkatkan kemampuan dalam pelacakan sel tumor sirkulasi (Zhang *et al.*, 2022). Selain itu, teknologi Tyramide Signal Amplification (TSA) memungkinkan deposisi kovalen radikal tirosil, menghasilkan amplifikasi sinyal yang signifikan dan menjadikannya alat yang sangat kuat untuk mendeteksi target dengan kelimpahan rendah (Grimm *et al.*, 2021).

Meskipun demikian, sistem deteksi fluoresensi menghadapi beberapa kendala, termasuk photobleaching – terutama pada fluorofor seperti FITC – serta autofluoresensi jaringan yang memerlukan metode quenching tambahan (Wu *et al.*, 2022). Biaya yang terkait dengan deteksi fluoresensi juga relatif tinggi, meskipun angka spesifik dapat bervariasi secara luas tergantung metode dan institusi (Tachibana *et al.*, 2020). Pertimbangan cermat terhadap tantangan teknis ini tetap

penting untuk mengoptimalkan penerapannya dalam diagnostik klinis dan penelitian (Ball *et al.*, 2023).

Ke depan, tren dalam deteksi fluoresensi menekankan penggunaan fluorofor switchable berbasis nanoteknologi untuk aktivasi spasio-temporal yang presisi, serta integrasi teknologi kecerdasan buatan (AI), termasuk platform yang menggunakan convolutional neural networks (CNN) untuk dekonvolusi dan analisis spektral (Cherkasov *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2020).



**Gambar 7.2** Deteksi Fluoresensi FITC/Alexa Fluor tanpa counterstain klasik.

### c. Deteksi Nanopartikel Logam

Sistem deteksi berbasis partikel logam memanfaatkan sifat plasmonik unik dari nanopartikel emas dan perak untuk memungkinkan visualisasi antigen dengan resolusi tinggi. Mekanisme intinya bergantung pada prinsip surface plasmon resonance (SPR), di mana osilasi elektron permukaan akibat interaksi dengan

panjang gelombang cahaya tertentu menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi (Hidalgo, 2021).

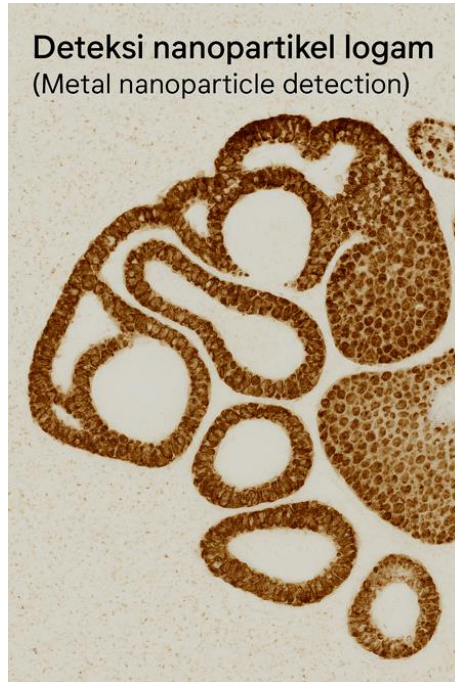
Nanopartikel emas, umumnya dengan diameter optimal 10–15 nm, biasanya disintesis melalui reduksi  $\text{HAuCl}_4$  menggunakan natrium sitrat. Partikel ini kemudian difungsionalisasi dengan antibodi serta polietilen glikol (PEG) untuk meningkatkan stabilitas dan afinitas ikatan (Kohale *et al.*, 2023). Sistem ini menunjukkan sensitivitas yang sangat tinggi, dengan limit of detection (LOD) serendah 0.001 ng/mm<sup>2</sup>, serta mampu mencapai resolusi spasial hingga 5 nm melalui mikroskop elektron transmisi (TEM) (Shojaeian, Lay and Zarnani, 2020).

Dalam aplikasi klinis, deteksi berbasis partikel logam terbukti krusial dalam studi ultrastruktur SARS-CoV-2, memungkinkan pemetaan distribusi protein spike dalam vesikel endositik pada sel epitel respiratorius. Höfert *et al.* (2022) melaporkan densitas nanopartikel emas berdiameter 10 nm sebesar  $32.7 \pm 4.2/\mu\text{m}^2$  pada sel terinfeksi, dengan korelasi yang kuat terhadap viral load (Mauriello *et al.*, 2022).

Analisis komparatif menegaskan keunggulan sistem berbasis logam dalam hal resolusi dan sensitivitas dibandingkan dengan metode berbasis enzimatik (resolusi 200 nm, LOD 0.5 ng/mm<sup>2</sup>) maupun fluoresensi (resolusi 180 nm, LOD 0.05 ng/mm<sup>2</sup>). Namun, penggunaannya masih terkendala oleh biaya yang tinggi serta kompatibilitas yang terbatas dengan sampel formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) (Mairaville and Martineau, 2021).

Arah pengembangan di masa depan untuk sistem deteksi berbasis partikel logam menekankan pada inovasi nanopartikel multifungsi yang mengintegrasikan kemampuan diagnostik sekaligus terapeutik, seperti foto termalisasi kanker. Selain itu, integrasi pemindaian TEM otomatis berbasis kecerdasan buatan (AI) menjanjikan

potensi analisis *high-throughput* (Hama *et al.*, 2022). Tantangan utama yang masih dihadapi meliputi optimasi penetrasi jaringan dan standarisasi protokol sintesis nanopartikel agar dapat mendukung adopsi klinis yang lebih luas (Silva *et al.*, 2023).



**Gambar 7.3** Deteksi nanopartikel logam gold + silver enhancement dengan mild counterstain

## 2. Klasifikasi Generasional

### a. Generasi 1 (Avidin-Biotin Complex/ABC)

Sistem ini memanfaatkan afinitas yang sangat tinggi antara biotin dan avidin, ditandai dengan konstanta disosiasi ( $K_d$ ) sekitar  $10^{-15}$  M. Sistem ABC secara efektif memperkuat sinyal; namun, penggunaannya terhambat oleh interferensi biotin endogen yang terdapat pada jaringan tertentu, sehingga menghasilkan pewarnaan latar yang tinggi. Akibatnya, rasio sinyal terhadap latar (S/N) relatif rendah bila dibandingkan dengan generasi

sistem deteksi berikutnya (Alferiev *et al.*, 2022; Whitehurst, 2023).

#### **b. Generasi 2 (Sistem Polimer)**

Pendekatan ini menggunakan polimer dekstran bercabang yang dapat dikonjugasikan dengan banyak enzim, menyediakan lebih dari 20 situs ikatan per molekul. Desain struktural ini menghasilkan peningkatan signifikan dalam rasio sinyal terhadap latar, dilaporkan meningkat hingga 300% dibandingkan sistem ABC. Secara khusus, sistem polimer-HRP telah menunjukkan peningkatan sensitivitas deteksi biomarker pada sampel formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), meskipun data spesifik seperti peningkatan 8 kali lipat dalam deteksi PD-L1 masih memerlukan sitasi yang lebih tepat (Miranda-Calderon *et al.*, 2023).

#### **c. Generasi 3 (Sistem Polimer Teramplifikasi)**

Generasi ini mengintegrasikan teknologi *tyramide signal amplification* (TSA) dengan sistem polimer. Dalam konfigurasi ini, horseradish peroxidase (HRP) mengaktifkan tyramide, menghasilkan transduksi sinyal yang teramplifikasi secara signifikan.

Klasifikasi generasional ini menunjukkan adanya kemajuan besar dalam bidang deteksi antigen, sekaligus memperlihatkan arah perkembangan yang jelas dalam peningkatan kapabilitas diagnostik dari waktu ke waktu. Peningkatan ini sangat penting untuk memperbaiki akurasi analisis biomarker, terutama dalam konteks pengobatan presisi dan terapi bertarget (Miranda-Calderon *et al.*, 2023; Whitehurst, 2023).

### **C. Komponen Utama dalam Sistem Deteksi**

#### **1. Enzim Pelapor (Reporter Enzymes)**

Horseradish peroxidase (HRP) merupakan enzim yang banyak digunakan dalam uji biokimia, dengan berat molekul sekitar 44 kDa dan bekerja optimal pada rentang pH 4,0–7,0. Enzim ini berfungsi melalui mekanisme katalitik berbasis

siklus redoks  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$ , menggunakan hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sebagai kofaktor. Salah satu keterbatasan HRP adalah kerentanannya terhadap inhibisi oleh zat seperti mioglobin pada jaringan otot serta aktivitas peroksidase endogen dalam eritrosit (Tiemann *et al.*, 2023). Sebaliknya, alkaline phosphatase (AP), yang berbentuk dimer dengan berat molekul sekitar 140 kDa, bekerja optimal pada pH 9,0 dan membutuhkan ion seng untuk katalisis. AP memiliki keunggulan dalam aplikasi *double-staining* karena stabilitasnya pada kondisi alkali, sehingga menjadi alat diagnostik yang berharga (Raza *et al.*, 2025).

## 2. Substrat dan Kromogen

Pemilihan substrat dan kromogen sangat menentukan kinerja keseluruhan uji IHC. 3,3'-diaminobenzidine (DAB) menghasilkan endapan coklat yang stabil dan banyak digunakan dalam IHC, meskipun dianggap sebagai karsinogen potensial sehingga perlu ditangani dengan hati-hati (Ren *et al.*, 2024). Fast Red, yang menghasilkan fluorofor merah, menunjukkan fotostabilitas sedang sehingga lebih sesuai untuk mounting berbasis akuosus pada aplikasi IHC. Vector® VIP menghasilkan endapan ungu dengan stabilitas baik, berguna dalam diferensiasi jaringan (Raza *et al.*, 2025). Pemilihan substrat biasanya ditentukan oleh kompatibilitas sistem: DAB lebih disukai untuk diagnostik rutin, sedangkan substrat fluoresen seperti TSA™ Plus Cyanine 3 digunakan untuk amplifikasi sinyal secara signifikan (Srambickal *et al.*, 2024).

## 3. Molekul Penghubung (Linking Molecules)

Streptavidin, protein tetramer dengan berat molekul 60 kDa, memiliki afinitas sangat tinggi terhadap biotin ( $K_d = 10^{-14}$  M), menjadikannya molekul penghubung yang efektif; namun, ia menghadapi kendala berupa ikatan non-spesifik dengan residu lisin pada jaringan (Tiemann *et al.*, 2023). Polimer dekstran, umumnya dengan berat molekul sekitar 500 kDa, mengatasi keterbatasan ini melalui struktur bercabang yang mampu menampung banyak enzim per

molekul. Desain inovatif ini meningkatkan rasio sinyal terhadap noise dan mengurangi gangguan non-spesifik bila dibandingkan dengan sistem avidin-biotin tradisional (Braubach *et al.*, 2020). Integrasi molekul penghubung ini dengan teknologi tyramide pada sistem polimer generasi lanjut (misalnya ImmPRESS® VR) memungkinkan amplifikasi sinyal yang signifikan, terutama untuk target langka seperti PD-L1, sehingga terbukti penting dalam diagnostik modern (Mistry *et al.*, 2020).

#### **D. Perbandingan Sistem Deteksi – Analisis Komparatif Sistem Deteksi Antigen**

Analisis komparatif sistem deteksi antigen memberikan gambaran menyeluruh mengenai kinerja pada berbagai parameter utama, sekaligus menyoroti keunggulan dan keterbatasan masing-masing sistem.

Sistem enzimatik berbasis polimer menunjukkan sensitivitas sebesar 0,5 ng/mm<sup>2</sup> dan mampu mencapai resolusi spasial hingga 200 nm, sehingga sangat sesuai untuk aplikasi diagnostik rutin. Prosedur ini umumnya dapat diselesaikan dalam waktu sekitar 90 menit dengan biaya sebesar USD 15–20 per sampel. Sistem ini memiliki kompatibilitas tinggi terhadap sampel formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE), hanya membutuhkan mikroskop cahaya standar, serta mampu memberikan hasil yang stabil selama lebih dari satu tahun (Uchida, Sasaki and Terasaki, 2020).

Sebagai perbandingan, sistem fluoresensi multiplex menawarkan sensitivitas yang lebih tinggi (0,05 ng/mm<sup>2</sup>) dengan resolusi spasial yang lebih baik yaitu 180 nm. Namun, sistem ini memerlukan waktu prosedur yang lebih lama, sekitar 240 menit, dan biaya yang lebih besar (USD 80–120 per sampel). Kemampuan untuk mendeteksi lebih dari 40 penanda secara simultan menjadikannya sangat ideal untuk penelitian kompleks. Meskipun demikian, kompatibilitasnya terhadap sampel FFPE hanya tergolong sedang, dan stabilitas hasil umumnya bertahan kurang dari satu bulan. Selain itu, sistem ini

membutuhkan mikroskop fluoresensi khusus, yang dapat membatasi aksesibilitas penggunaannya (Cheng *et al.*, 2020).

Sistem deteksi immunogold-silver menunjukkan sensitivitas yang sangat tinggi (0,001 ng/mm<sup>2</sup>) dengan resolusi ultrastruktural hingga 5 nm, dan hasilnya dapat tetap stabil selama lebih dari lima tahun. Akan tetapi, prosedurnya relatif panjang, mencapai hingga 72 jam, serta memerlukan biaya yang jauh lebih besar (USD 300–500 per sampel). Di samping itu, sistem ini memiliki kompatibilitas rendah terhadap sampel FFPE dan bergantung pada instrumen canggih seperti transmission electron microscopy (TEM) atau scanning electron microscopy (SEM), sehingga penggunaannya terbatas pada fasilitas dengan teknologi khusus (Immler *et al.*, 2024).

**Tabel 7.1** Analisis Komparatif Sistem Deteksi

<b>Parameter</b>	<b>Sistem Enzimatis Berbasis Polimer</b>	<b>Sistem Fluoresensi Multiplex</b>	<b>Sistem Immunogold-Silver</b>
Sensitivitas (LOD)	0,5 ng/mm <sup>2</sup>	0,05 ng/mm <sup>2</sup>	0,001 ng/mm <sup>2</sup>
Resolusi Spasial	200 nm	180 nm	5 nm
Waktu Prosedur	90 menit	240 menit	72 jam
Kapasitas Multiplex	2–3 target	>40 target	1–2 target
Biaya per Sampel	USD 15–20	USD 80–120	USD 300–500
Kompatibilitas FFPE	Tinggi	Sedang	Rendah
Kebutuhan Peralatan	Mikroskop cahaya	Mikroskop fluoresensi	TEM/SEM
Stabilitas Hasil	>1 tahun	<1 bulan	>5 tahun

Arah penelitian di masa depan sebaiknya difokuskan pada peningkatan kemampuan sistem ini, seperti mengoptimalkan penetrasi jaringan, standarisasi protokol sintesis nanopartikel, serta menurunkan hambatan biaya untuk memungkinkan adopsi klinis yang lebih luas (Huss and Coupland, 2020; Friedrich *et al.*, 2021). Setiap sistem deteksi memiliki keunggulan dan keterbatasan unik yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan metode paling tepat untuk aplikasi penelitian maupun diagnostik tertentu.

#### **E. Faktor yang Mempengaruhi Kualitas Deteksi**

Kualitas deteksi antigen dalam imunohistokimia (IHC) sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor penting, antara lain optimasi antibodi, kondisi reaksi, dan penanganan artefak. Faktor-faktor ini berperan besar dalam menentukan sensitivitas, spesifisitas, serta reproduibilitas hasil. Studi multisenter menunjukkan bahwa pengendalian yang suboptimal terhadap faktor-faktor tersebut dapat menyebabkan terjadinya kesalahan diagnostik, sehingga menekankan pentingnya pelaksanaan prosedur IHC secara cermat (Meyerholz *et al.*, 2023).

Salah satu faktor utama yang memengaruhi kualitas deteksi adalah optimasi antibodi. Titrasi antibodi melalui kurva dosis-respons diperlukan untuk menentukan rasio optimal antara sinyal dan latar belakang, sehingga dapat mencegah terjadinya under-staining maupun over-staining pada jaringan. Konfirmasi terhadap spesifisitas antibodi juga sangat penting untuk memastikan bahwa ikatan hanya terjadi pada epitop target yang dimaksud (Lian *et al.*, 2021). Selain itu, stabilitas konjugat enzim-antibodi, seperti horseradish peroxidase (HRP), harus diuji secara berkala setelah proses konjugasi, karena degradasi enzim dapat menyebabkan penurunan sensitivitas yang signifikan. Penelitian menunjukkan bahwa strategi validasi yang ketat mampu meningkatkan reliabilitas diagnostik, terutama dalam peningkatan akurasi deteksi biomarker di berbagai konteks klinis (Wang *et al.*, 2021).

Kondisi reaksi juga menjadi penentu penting dalam keberhasilan IHC. Beberapa parameter optimal telah didefinisikan, seperti menjaga pH inkubasi pada kisaran 7,2-7,4 menggunakan phosphate-buffered saline (PBS) untuk mempertahankan konformasi antibodi. Proses inkubasi jaringan pada suhu 4°C semalam dapat membantu mengurangi ikatan nonspesifik, yang cenderung lebih tinggi pada suhu ruang di atas 25°C. Durasi inkubasi juga harus diawasi dengan ketat; rentang waktu 30-60 menit dianggap optimal, karena paparan lebih lama dapat menyebabkan kejenuhan sinyal dan penumpukan pada situs ikatan. Selain itu, kekuatan ionik berperan penting, dengan konsentrasi natrium klorida sekitar 150 mM direkomendasikan; konsentrasi yang lebih tinggi dapat mengganggu interaksi ikatan antibodi. Kepatuhan terhadap parameter suhu inkubasi yang optimal terbukti dapat mengurangi variabilitas hasil, khususnya pada sampel yang difiksasi formalin dan dibenamkan parafin (FFPE) (Hama *et al.*, 2022).

Manajemen artefak merupakan aspek krusial untuk memastikan visualisasi antigen yang akurat. Auto Fluoresensi, yang sering kali berasal dari komponen jaringan, dapat dikurangi dengan strategi blocking tertentu. Aktivitas peroksidase endogen, terutama pada eritrosit, dapat dihambat secara efektif menggunakan hidrogen peroksida 3% dalam metanol untuk menghilangkan gangguan latar belakang. Selain itu, pewarnaan nonspesifik yang berlebihan dapat ditekan dengan penggunaan blocking serum sebagai bagian dari protokol standar.

Pada akhirnya, penerapan kontrol kualitas yang ketat serta inovasi terkini telah meningkatkan keandalan sistem deteksi IHC. Penerapan kontrol internal, misalnya jaringan normal yang ditempatkan berdampingan dengan jaringan uji, serta kepatuhan terhadap prosedur yang terstandar terbukti dapat secara signifikan mengurangi kesalahan interpretasi dalam praktik klinis ((Novakov *et al.*, 2023). Pendekatan inovatif, termasuk penggunaan sistem buffer canggih untuk mencegah

terbentuknya artefak, serta platform digital yang mendukung reproduktibilitas, semakin diakui sebagai instrumen penting untuk mengatasi variabilitas dalam proses pewarnaan (Kirbiš *et al.*, 2020).

Dengan demikian, kualitas deteksi antigen dalam IHC sangat bergantung pada keseimbangan antara performa antibodi, kondisi reaksi yang teroptimasi, pengelolaan artefak yang efektif, serta pengendalian kualitas yang ketat. Inovasi seperti pengembangan kimia buffer yang lebih baik dan kemajuan dalam patologi digital diperkirakan akan semakin meningkatkan akurasi dan reproduktibilitas, baik dalam penelitian maupun aplikasi klinis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alferiev, I.S. *et al.* (2022) "Intraprocedural Endothelial Cell Seeding of Arterial Stents via Biotin/Avidin Targeting Mitigates in-Stent Restenosis." Available at: <https://doi.org/10.1101/2022.05.25.493423>.
- Ball, J.B. *et al.* (2023) "Combining RNAscope and Immunohistochemistry to Visualize Inflammatory Gene Products in Neurons and Microglia," *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1225847>.
- Banala, S. *et al.* (2022) "2,7-Diaminobenzopyrylium Dyes Are Live-Cell Mitochondrial Stains," *Acs Bio & Med Chem Au*, 2(3), pp. 307–312. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsbiochemau.1c00068>.
- Braubach, O. *et al.* (2020) "P01.05 Development of Signal Amplification for Spatially-Resolved, Highly Multiplexed Biomarker Analysis of Human Tumor Tissues." Available at: <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-itoc7.18>.
- Cascone, T. *et al.* (2022) "Abstract CT011: NeoCOAST: Open-Label, Randomized, Phase 2, Multidrug Platform Study of Neoadjuvant Durvalumab Alone or Combined With Novel Agents in Patients (Pts) With Resectable, Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC)," *Cancer Research*, 82(12\_Supplement), pp. CT011–CT011. Available at: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2022-ct011>.
- Cheng, L.Y. *et al.* (2020) "High Sensitivity Sanger Sequencing Detection of BRAF Mutations in Metastatic Melanoma FFPE Tissue Specimens." Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-109681/v1>.
- Cherkasov, V.K. *et al.* (2020) "Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials With on/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets," *Acs Nano*, 14(2), pp. 1792–1803. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b07569>.

- Cheung, A. *et al.* (2021) "Quantitative Single-Cell Analysis of Immunofluorescence Protein Multiplex Images Illustrates Biomarker Spatial Heterogeneity Within Breast Cancer Subtypes," *Breast Cancer Research*, 23(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01475-y>.
- Fan, H. *et al.* (2023) "Surface Ligand Engineering Ruthenium Nanozyme Superior to Horseradish Peroxidase for Enhanced Immunoassay," *Advanced Materials*, 36(10). Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.202300387>.
- Fanelli, C. *et al.* (2023) "Tamoxifen Associated to the Conservative CKD Treatment Promoted Additional Antifibrotic Effects on Experimental Hypertensive Nephrosclerosis," *Scientific Reports*, 13(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-39299-9>.
- Flory, A. *et al.* (2023) "Cancer Detection in Clinical Practice and Using Blood-based Liquid Biopsy: A Retrospective Audit of Over 350 Dogs," *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37(1), pp. 258–267. Available at: <https://doi.org/10.1111/jvim.16616>.
- Friedrich, C. *et al.* (2021) "Comprehensive Micro-Scaled Proteome and Phosphoproteome Characterization of Archived Retrospective Cancer Repositories," *Nature Communications*, 12(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23855-w>.
- Giarretta, J.E. *et al.* (2021) "Paper-Based, Chemiresistive Sensor for Hydrogen Peroxide Detection," *Advanced Materials Technologies*, 6(4). Available at: <https://doi.org/10.1002/admt.202001148>.
- Grimm, J.B. *et al.* (2021) "A General Method to Improve Fluorophores Using Deuterated Auxochromes," *Jacs Au*, 1(5), pp. 690–696. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacsau.1c00006>.

- Hama, H.O. *et al.* (2022) "Immunohistochemical Diagnosis of Human Infectious Diseases: A Review," *Diagnostic Pathology*, 17(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13000-022-01197-5>.
- Hena, J.Y. *et al.* (2024) "Chiral Biocatalytic Oxidations at 90 °C in Microemulsions Driven by Electrocatalytic Oxygen Reduction to Hydrogen Peroxide," *Chemelectrochem*, 11(11). Available at: <https://doi.org/10.1002/celc.202300584>.
- Hidalgo, C.O. (2021) "Immunohistochemistry in Historical Perspective: Knowing the Past to Understand the Present," pp. 17–31. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_2).
- Huang, X. *et al.* (2022) "Metallic Nanomaterials With Mimic Oxidoreductase Enzyme Activity: New Insight for Sensing and Biosensing," *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 19(2), pp. 231–241. Available at: <https://doi.org/10.2174/1570193x18666210422115819>.
- Huss, R. and Coupland, S.E. (2020) "Software-assisted Decision Support in Digital Histopathology," *The Journal of Pathology*, 250(5), pp. 685–692. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.5388>.
- Immmler, M. *et al.* (2024) "Expression of Somatostatin Receptors in Canine and Feline Meningioma," *Veterinary Medicine and Science*, 10(4). Available at: <https://doi.org/10.1002/vms3.1537>.
- Kang, H. *et al.* (2022) "Tumor-Associated Immune-Cell-Mediated Tumor-Targeting Mechanism With NIR-II Fluorescence Imaging," *Advanced Materials*, 34(8). Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.202106500>.
- Kirbiš, I.S. *et al.* (2020) "Preservation of Biomarkers Immunoreactivity on Cytospins Protected With Polyethylene Glycol," *Cytopathology*, 32(1), pp. 84–91. Available at: <https://doi.org/10.1111/cyt.12913>.

- Kohale, M. *et al.* (2023) "Immunohistochemistry in Pathology: A Review," *Journal of Cellular Biotechnology*, 9(2), pp. 131–138. Available at: <https://doi.org/10.3233/jcb-230110>.
- Kumar, R.K.R. *et al.* (2023) "Recent Advances and Emerging Trends in Cancer Biomarker Detection Technologies," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 62(14), pp. 5691–5713. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c04097>.
- Li, D. and Smith, B.D. (2021) "Deuterated Indocyanine Green (ICG) With Extended Aqueous Storage Shelf-Life: Chemical and Clinical Implications," *Chemistry - A European Journal*, 27(58), pp. 14535–14542. Available at: <https://doi.org/10.1002/chem.202102816>.
- Lian, X. *et al.* (2021) "Two Monoclonal Antibodies That Specifically Recognize Aspergillus Cell Wall Antigens and Can Detect Circulating Antigens in Infected Mice," *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), p. 252. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms23010252>.
- Mairaville, C. and Martineau, P. (2021) "Antibody Identification for Antigen Detection in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Using Phage Display and Naïve Libraries," *Antibodies*, 10(1), p. 4. Available at: <https://doi.org/10.3390/antib10010004>.
- Mauriello, S. *et al.* (2022) "Antigenicity Preservation Is Related to Tissue Characteristics and the Post-Mortem Interval: Immunohistochemical Study and Literature Review," *Healthcare*, 10(8), p. 1495. Available at: <https://doi.org/10.3390/healthcare10081495>.
- Mei, K. *et al.* (2022) "Magneto-Nanomechanical Array Biosensor for Ultrasensitive Detection of Oncogenic Exosomes for Early Diagnosis of Cancers," *Small*, 19(9). Available at: <https://doi.org/10.1002/sml.202205445>.

- Meyerholz, D.K. *et al.* (2023) "Immunohistochemical Detection of MUC5AC and MUC5B Mucins in Ferrets," *BMC Research Notes*, 16(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s13104-023-06388-x>.
- Miranda-Calderon, L. *et al.* (2023) "Antibody-Functionalized Polymer Nanoparticles for Targeted Antibiotic Delivery in Models of Pathogenic Bacteria Infecting Human Macrophages," *Acs Applied Materials & Interfaces*, 15(34), pp. 40213–40227. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsami.3c07367>.
- Mistry, S. *et al.* (2020) "Abstract 387: Analysis of FFPE Human Tumor Tissues Using CODEX With Signal Amplification," *Cancer Research*, 80(16\_Supplement), p. 387. Available at: <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2020-387>.
- Moser, S. *et al.* (2021) "A Five Amino Acids Deletion in NKCC2 of C57bl/6 Mice Affects Analysis of NKCC2 Phosphorylation but Does Not Impact Kidney Function," *Acta Physiologica*, 233(1). Available at: <https://doi.org/10.1111/apha.13705>.
- Mueller, S.K. *et al.* (2020) "Significant Polyomic and Functional Upregulation of the PAPP-A/IGFBP-4/5/IGF-1 Axis in Chronic Rhinosinusitis With Nasal Polyps," *International Forum of Allergy & Rhinology*, 10(4), pp. 546–555. Available at: <https://doi.org/10.1002/alr.22512>.
- Nesa, M.L. *et al.* (2025) "Crystal Structure of Ferric Recombinant Horseradish Peroxidase," *Jbic Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 30(3), pp. 221–227. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00775-025-02103-2>.
- Novakov, T. *et al.* (2023) "Immunohistochemical Investigation of FIPV3-70 Antigen Expression in the Ileum of Cats With Effusive Feline Infective Peritonitis," *Acta Veterinaria*, 73(3), pp. 432–438. Available at: <https://doi.org/10.2478/acve-2023-0032>.

- Pham, T.H. *et al.* (2021) "Multiplexed in Situ Protein Profiling With High-Performance Cleavable Fluorescent Tyramide," *Molecules*, 26(8), p. 2206. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules26082206>.
- RASHIDOVA, N., Say, R. and Ersöz, A. (2025) "Amino Acid Monomer Ligand-Exchanged Zeolitic Imidazolate Framework (ZIF) Based Active Site Mimicking of Peroxidase," *Chemistryselect*, 10(34). Available at: <https://doi.org/10.1002/slct.202502700>.
- Raza, Q. *et al.* (2025) "Comparative Analysis of Immunohistochemistry and Imaging Mass Cytometry Technologies for Detection of Clinical Biomarkers in Cancer Tissues.," *Journal of Clinical Oncology*, 43(16\_suppl). Available at: [https://doi.org/10.1200/jco.2025.43.16\\_suppl.e14628](https://doi.org/10.1200/jco.2025.43.16_suppl.e14628).
- Ren, X. *et al.* (2024) "Auxochrome Dimethyl-Dihydroacridine Improves Fluorophores for Prolonged Live-Cell Super-Resolution Imaging," *Journal of the American Chemical Society*, 146(10), pp. 6566–6579. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.3c11823>.
- Sharma, A. *et al.* (2020) "Photostable and Orthogonal Solvatochromic Fluorophores for Simultaneous *In Situ* Quantification of Multiple Cellular Signaling Molecules," *Acs Chemical Biology*, 15(7), pp. 1913–1920. Available at: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00241>.
- Shojaeian, S., Lay, N.M. and Zarnani, A. (2020) "Detection Systems in Immunohistochemistry." Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82072>.
- Silva, L.A. d. *et al.* (2023) "Antigenic and Molecular Evidence of Brucella Sp.-Associated Epididymo-Orchitis in Frugivorous (*Artibeus lituratus*) and Nectarivorous (*Glossophaga soricina*) Bats in Brazil," *Frontiers in Veterinary Science*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1235299>.

- Srambickal, C.V. *et al.* (2024) "Near-Infrared MINFLUX Imaging Enabled by Suppression of Fluorophore Blinking." Available at: <https://doi.org/10.1101/2024.08.27.609859>.
- Tachibana, R. *et al.* (2020) "Molecular Design Strategy of Fluorogenic Probes Based on Quantum Chemical Prediction of Intramolecular Spirocyclization," *Communications Chemistry*, 3(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s42004-020-0326-x>.
- Tansini, A. *et al.* (2020) "Evaluation of Low Concentration Glyphosate Effect on Horseradish Peroxidase Enzyme Activity," *Revista Acta Ambiental Catarinense*, 16(1/2), p. 46. Available at: <https://doi.org/10.24021/raac.v16i1/2.5247>.
- Tiemann, M. *et al.* (2023) "The Cytomorphology of Melanoma With a Special Emphasis on the Immune Checkpoint Proteins CTLA-4, PD-1, and PD-L1," 1(2), pp. 44–52. Available at: <https://doi.org/10.61474/ncs.2023.00013>.
- Uchida, Y., Sasaki, H. and Terasaki, T. (2020) "Establishment and Validation of Highly Accurate Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Quantitative Proteomics by Heat-Compatible Pressure Cycling Technology Using Phase-Transfer Surfactant and SWATH-MS," *Scientific Reports*, 10(1). Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68245-2>.
- Velasco-Vales, V. *et al.* (2021) "Immunohistochemistry, Quality Control, and Principles of Validation in the Central Nervous System," pp. 203–216. Available at: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1948-3_14).
- Wang, Q. *et al.* (2021) "A Predictive Signature for Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Based Chemotherapy in Locally Advanced Gastric Cancer," *Translational Oncology*, 14(1), p. 100901. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100901>.
- Whitehurst, C.B. (2023) "An Analysis of the Biotin–(Strept)avidin System in Immunoassays: Interference and Mitigation Strategies," *Current Issues in Molecular Biology*, 45(11), pp.

8733–8754. Available at:  
<https://doi.org/10.3390/cimb45110549>.

Wu, C. *et al.* (2022) “Small-Molecule Modulated Affinity-Tunable Semisynthetic Protein Switches,” *Acs Sensors*, 7(9), pp. 2691–2700. Available at:  
<https://doi.org/10.1021/acssensors.2c01211>.

Zhang, X. *et al.* (2022) “A Universal Photoactivatable Tag Attached to Fluorophores Enables Their Use for Single-Molecule Imaging,” *Angewandte Chemie*, 61(46). Available at:  
<https://doi.org/10.1002/anie.202211767>.

# BAB 8

## METODE *DIRECT* DAN *INDIRECT* DALAM IMUNOHISTOKIMIA

dr. Nana Liana, Sp.PA.

### A. Pendahuluan

Imunohistokimia (IHK) merupakan teknik penting dalam biologi molekuler dan diagnostik yang menggabungkan prinsip imunologi dengan teknik histologi untuk mendeteksi antigen spesifik dalam potongan jaringan. Teknik ini memanfaatkan interaksi spesifik antara antibodi dan antigen kemudian divisualisasikan melalui label enzim atau fluorokrom untuk memperlihatkan distribusi, intensitas, dan lokalisasi protein dalam konteks arsitektur jaringan (misalnya nukleus, sitoplasma, membran sel). Sebagai metode yang mempertahankan struktur morfologis jaringan, IHK menjadi pilar dalam patologi modern dan penelitian translasi, terutama dalam pengembangan biomarker dan terapi target (Kim et al., 2016).

Dalam penerapannya, terdapat dua pendekatan utama yang sering digunakan pada IHK, yakni metode *direct* dan *indirect*. Metode *direct* menggunakan antibodi primer yang telah dilabel (misalnya dengan peroksidase atau fluorokrom), sehingga ia langsung mengenali antigen target dalam satu langkah. Metode ini sederhana dan cepat, tetapi terkadang kurang sensitif untuk mendeteksi antigen dalam jumlah rendah atau epitope yang tersembunyi. Di sisi lain, metode *indirect* menggunakan antibodi primer yang tidak dilabel, diikuti oleh antibodi sekunder yang mengenali antibodi primer. Pendekatan

ini memungkinkan amplifikasi sinyal (karena antibodi sekunder dapat membawa banyak molekul label) dan meningkatkan sensitivitas, meskipun memerlukan langkah tambahan dan memperbesar risiko latar belakang nonspesifik. (Kim et al., 2016; Magaki et al., 2019)

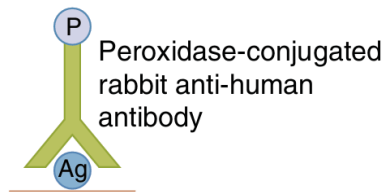
Dalam dekade terakhir, inovasi dan modifikasi dari kedua metode dasar tersebut berkembang pesat untuk menjawab keterbatasan klasik, terutama dalam konteks kebutuhan klinis dan penelitian tingkat tinggi. Teknik multiplex IHC (mIHC) yang memungkinkan pewarnaan beberapa antigen dalam satu penampang jaringan telah menjadi tren utama, mendukung analisis spasial sel dan mikro-lingkungan jaringan sebagai pendekatan presisi biologi tumor dan sistem imunologi. Selain itu, otomatisasi, optimasi protokol antigen retrieval, sistem deteksi berbasis polimer, dan integrasi dengan digital image analysis/AI semakin memperluas potensi dan akurasi IHC modern. (Kim et al., 2016) Dengan demikian, memahami secara mendalam metode direct dan indirect serta modifikasinya menjadi landasan penting dalam penyusunan protokol IHC yang valid dan dapat diandalkan dalam penelitian maupun praktik diagnostik klinis.

## **B. Metode *Direct***

Metode direct IHC menggunakan antibodi primer yang sudah dilabel (misalnya horseradish peroxidase (HRP)/alkalin fosfatase atau fluorokrom) untuk berikatan langsung dengan antigen target pada sel; karena hanya satu tahap ikatan antigen-antibodi, pembacaan sinyal dapat dilakukan segera setelah pencucian dan pengembangan substrat/observasi fluoresen. Pendekatan ini mempertahankan arsitektur jaringan dan memungkinkan pemetaan lokalisasi protein in situ, sehingga tetap relevan untuk keperluan diagnostik terbatas dan verifikasi cepat antigen yang berlimpah. (Hawes et al., 2020)

## Tahapan prosedur

Tahapan metode direct IHK dimulai dengan persiapan sampel jaringan, yang umumnya difiksasi menggunakan formalin buffered 10% untuk menjaga morfologi sel dan kestabilan antigen. Sampel kemudian diproses ke dalam blok parafin, dipotong tipis sekitar 3–5  $\mu\text{m}$ , dan ditempelkan pada slide berlapis polilisina untuk meningkatkan daya lekat. Selanjutnya dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi, di mana parafin dihilangkan melalui rendaman xylol, lalu jaringan dilewatkan pada larutan alkohol bertingkat hingga air suling untuk mengembalikan kondisi jaringan ke keadaan berair dan siap diwarnai (Kim et al., 2016).



**Gambar 8.1** Representasi skematis teknik IHK langsung menggunakan HRP. (Grizzle et al., 2007)

Langkah berikutnya adalah antigen retrieval yang bertujuan membuka kembali epitope yang mungkin tertutupi akibat proses fiksasi formalin. Dua metode yang umum digunakan adalah *heat-induced epitope retrieval* (HIER), dengan pemanasan dalam buffer sitrat atau EDTA, dan metode enzimatis yang menggunakan protease seperti trypsin atau pepsin. Setelah antigen retrieval, dilakukan blocking untuk mencegah ikatan non-spesifik dan mengurangi pewarnaan latar belakang. Blocking dapat menggunakan serum normal, bovine serum albumin (BSA), atau larutan hidrogen peroksida untuk menonaktifkan enzim endogen seperti peroksidase. (Magaki et al., 2019)

Tahap inti dari metode direct adalah inkubasi dengan antibodi primer berlabel, yaitu antibodi yang sudah terkonjugasi langsung dengan enzim (misalnya HRP atau alkaline

phosphatase) atau fluorokrom. Antibodi ini akan berikatan langsung dengan antigen target pada jaringan (gambar 8.1). Setelah inkubasi, dilakukan deteksi: bila label berupa enzim, maka ditambahkan substrat kromogen seperti diaminobenzidine (DAB) yang menghasilkan presipitat coklat di lokasi antigen; bila label berupa fluorokrom, sampel diamati dengan mikroskop fluoresen untuk melihat emisi cahaya pada panjang gelombang tertentu. Sebagai langkah akhir, jaringan diberi counterstaining dengan hematoxylin untuk memberikan kontras visual pada inti sel, kemudian ditutup dengan medium mounting. Preparat siap diamati di bawah mikroskop cahaya atau fluoresen untuk mengidentifikasi distribusi antigen dan intensitas pewarnaan.(Magaki et al., 2019)

### **C. Kekurangan Metode *Direct***

Keterbatasan paling konsisten adalah sensitivitas lebih rendah dibanding metode indirect karena hanya ada satu antibodi yang membawa label per antigen, sehingga amplifikasi sinyal minimal. Dampaknya, deteksi antigen low-abundance lebih menantang; selain itu, ketersediaan antibodi primer yang sudah dilabel tidak seluas antibodi primer non-label dan biaya per penanda seringkali lebih tinggi. Oleh sebab itu, untuk kebutuhan diagnostik/riset dengan target ber-ekspresi rendah atau multiplexing, pendekatan indirect (termasuk sistem polimer dan Avidin-biotin complex (ABC)) umumnya lebih disukai.(Janardhan et al., 2018)

### **D. Kelebihan Metode *Direct***

Kelebihan utama metode direct adalah kesederhanaan dan waktu yang lebih singkat, karena hanya melibatkan satu antibodi dan tidak memerlukan tahap inkubasi antibodi sekunder. Hal ini mengurangi potensi variasi teknis dan risiko pewarnaan latar belakang akibat antibodi sekunder. Selain itu, direct IHK meminimalkan kemungkinan cross-reactivity dengan spesies antibodi lain sehingga lebih spesifik bila digunakan untuk antigen dengan ekspresi tinggi. Oleh karena itu, metode

ini sering dipilih dalam kondisi di mana hasil cepat diperlukan, misalnya pemeriksaan intra operatif atau analisis jaringan beku. (Janardhan et al., 2018).

#### **E. Metode *Indirect***

Metode indirect IHK menggunakan dua lapis antibodi, yaitu antibodi primer yang mengenali antigen target dan antibodi sekunder berlabel (enzim atau fluorokrom) yang mengenali antibodi primer. Prinsip ini memungkinkan amplifikasi sinyal, karena satu antibodi primer dapat berikatan dengan beberapa antibodi sekunder, sehingga meningkatkan sensitivitas deteksi. Oleh karena itu, metode indirect telah menjadi pendekatan utama dalam diagnostik histopatologi modern dan penelitian biomarker dibanding metode direct yang lebih sederhana namun kurang sensitive. (Grizzle et al., 2007; Janardhan et al., 2018)

Dalam metode indirect IHK, antibodi primer memegang peranan kunci karena dirancang untuk mengenali antigen target secara spesifik dengan afinitas tinggi. Antibodi primer ini dapat berupa monoklonal, yang diproduksi dari satu klon sel B sehingga bersifat sangat spesifik terhadap satu epitope tunggal, atau poliklonal, yang berasal dari campuran klon sel B sehingga dapat mengenali beberapa epitope dari antigen yang sama. Pemilihan jenis antibodi primer bergantung pada tujuan pemeriksaan: antibodi monoklonal lebih konsisten dan spesifik, sedangkan antibodi poliklonal sering kali memberikan sinyal lebih kuat karena dapat mengenali beberapa epitope sekaligus. (Kim et al., 2016)

Setelah antibodi primer menempel pada antigen target di jaringan, tahap berikutnya adalah pemberian antibodi sekunder. Antibodi sekunder ini dikembangkan untuk mengenali imunoglobulin dari spesies tertentu tempat antibodi primer berasal. Misalnya, jika antibodi primer berasal dari tikus, maka antibodi sekunder anti-tikus akan digunakan. Yang membedakan antibodi sekunder adalah adanya label yang terkonjugasi pada molekulnya, berupa enzim seperti HRP atau

alkaline phosphatase, maupun pewarna fluoresen (fluorokrom). Enzim yang terkonjugasi akan bereaksi dengan substrat tertentu untuk menghasilkan end product berwarna yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya, sedangkan fluorokrom memancarkan cahaya fluoresen pada panjang gelombang tertentu yang dideteksi dengan mikroskop fluoresen (Harms et al., 2023).

Keunggulan utama penggunaan antibodi sekunder adalah efisiensi dan fleksibilitasnya. Satu jenis antibodi sekunder berlabel dapat diaplikasikan pada berbagai antibodi primer yang berasal dari spesies hewan yang sama. Sebagai contoh, antibodi sekunder anti-mouse yang berlabel HRP dapat digunakan untuk mendeteksi berbagai antibodi primer yang diproduksi dari tikus. Hal ini tidak hanya menghemat biaya, tetapi juga menyederhanakan kebutuhan inventaris di laboratorium. Selain itu, karena beberapa antibodi sekunder dapat berikatan dengan satu antibodi primer, terjadi amplifikasi sinyal yang membuat metode indirect jauh lebih sensitif dibandingkan metode direct (Hawes et al., 2020).

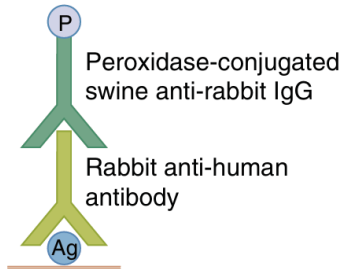
## **F. Variasi Metode *Indirect***

Seiring perkembangan teknologi, beberapa variasi metode indirect IHK telah dikembangkan untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas pewarnaan jaringan.

### **1. *Two-step method***

Pada metode two-step, prosedur hanya melibatkan dua lapisan: antibodi primer yang mengenali antigen target, diikuti oleh antibodi sekunder yang telah dilabeli langsung dengan enzim atau fluorokrom. Antibodi sekunder berlabel ini diarahkan terhadap imunoglobulin dari spesies hewan asal antibodi primer, sehingga mampu memvisualisasikan antibodi primer yang tidak berlabel (Gambar 8.2). Pelabelan dengan HRP merupakan teknik yang paling umum digunakan, biasanya dikombinasikan dengan substrat kromogen yang sesuai. Dibandingkan dengan metode langsung tradisional, teknik ini lebih sensitif karena sejumlah

antibodi sekunder dapat berikatan dengan berbagai epitop pada antibodi primer, sehingga memperkuat amplifikasi sinyal. Selain itu, metode ini juga menawarkan fleksibilitas yang lebih tinggi, sebab satu jenis antibodi sekunder berlabel dapat digunakan untuk berbagai antibodi primer yang berasal dari spesies hewan yang sama (Grizzle et al., 2007; Ramos-Vara, 2005).



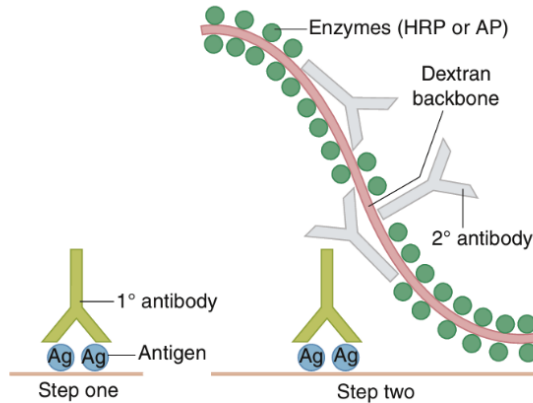
**Gambar 8.2** Representasi skematis teknik IHC tidak langsung menggunakan HRP (Grizzle et al., 2007).

## 2. *Polymer chain two-step*

Metode Teknologi ini menggunakan antibodi primer yang tidak terkonjugasi, kemudian dilanjutkan dengan antibodi sekunder yang dikonjugasikan dengan enzim HRP pada rantai polimer berlabel, seperti dekstran (Gambar 8.3). Satu rantai dekstran mampu membawa hingga 70 molekul enzim dan 10 molekul antibodi. Konjugasi antibodi sekunder anti-mouse dan anti-rabbit memungkinkan satu reagen digunakan untuk berbagai antibodi primer, baik monoklonal (mouse dan rabbit) maupun poliklonal (rabbit) (Grizzle et al., 2007).

Metode ini tidak menggunakan biotin sehingga bebas dari interaksi dengan biotin endogen. Selain memiliki kecepatan, konsistensi, dan kemudahan reproduksi yang baik, teknik ini juga menawarkan sensitivitas yang sangat tinggi. Teknik ini bermanfaat untuk pewarnaan multi-warna pada satu preparat slide dan saat ini menjadi metode yang paling sering digunakan dalam pemeriksaan diagnostik

rutin. Berbagai kit polimer komersial telah tersedia, antara lain EnVision™+ dan FLEX+ (Dako), Novolink serta Bond Polymer Refine (Leica), Immpress™ (Vector Laboratories), Excel+ (Menarini), dan ultraVIEW (Ventana). (Grizzle et al., 2007; Ramos-Vara, 2005).



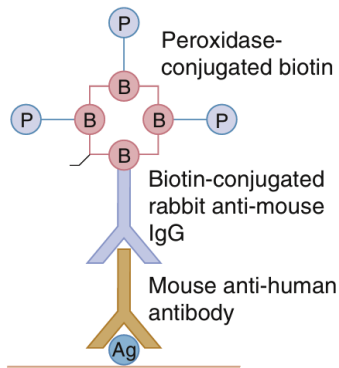
**Gambar 8.3** Representasi skematis teknik IHC tidak langsung dua tahap berbasis rantai polimer menggunakan HRP (Grizzle et al., 2007)

### 3. *Avidin-biotin complex (ABC)*

Metode ini merupakan teknik tiga tahap. Tahap pertama menggunakan antibodi primer yang tidak terkonjugasi, tahap kedua menggunakan antibodi sekunder yang telah dibiotinilasi (dibangkitkan terhadap spesies asal antibodi primer), dan tahap ketiga menggunakan kompleks biotin berlabel enzim dengan streptavidin atau streptavidin berlabel enzim (Gambar 8.4). Enzim yang digunakan biasanya horseradish peroxidase atau alkaline phosphatase, yang dipadukan dengan kromogen sesuai kebutuhan. (Grizzle et al., 2007)

Prinsip metode ini didasarkan pada afinitas tinggi avidin (berat molekul 67 kDa) terhadap biotin (berat molekul 244 Da). Namun, avidin memiliki dua kelemahan utama. Pertama, titik isoelektriknya cukup tinggi ( $\pm 10$ ), sehingga

bermuatan positif pada pH netral dan dapat berikatan secara nonspesifik dengan struktur bermuatan negatif, seperti inti sel. Kedua, avidin merupakan glikoprotein yang dapat bereaksi dengan lektin melalui gugus karbohidratnya, sehingga menimbulkan pewarnaan nonspesifik. Untuk mengatasi hal tersebut, digunakan streptavidin (berat molekul 60 kDa), yang lebih stabil dan tidak menimbulkan reaksi silang.(Grizzle et al., 2007)



**Gambar 8.4** Representasi skematis teknik IHK avidin-biotin menggunakan HRP (Grizzle et al., 2007).

Streptavidin diisolasi dari *Streptomyces avidinii* dan, sama seperti avidin, memiliki empat situs pengikatan dengan afinitas tinggi terhadap biotin. Namun, karena faktor susunan molekul, tidak semua situs pengikatan dapat berinteraksi secara efektif. Biotin (vitamin H) mudah dikonjugasikan dengan antibodi maupun enzim penanda. Bahkan, hingga 150 molekul biotin dapat melekat pada satu antibodi dengan bantuan spacer arms, sehingga memungkinkan pengikatan optimal oleh streptavidin.

Teknik streptavidin-biotin dapat dilakukan dengan dua pendekatan. Pertama, enzim langsung terikat pada streptavidin. Kedua, enzim dibiotinilasi sehingga membentuk kompleks streptavidin-biotin. Metode kedua umumnya tersedia secara komersial dalam bentuk dua

reagen terpisah (label biotinilasi dan streptavidin), yang kemudian dicampurkan sekitar 30 menit sebelum digunakan agar kompleks terbentuk sempurna. Pengendalian stoikiometri yang baik memastikan sebagian situs pengikatan tetap tersedia untuk berinteraksi dengan antibodi sekunder yang telah dibiotinilasi. (Grizzle et al., 2007)

Karena satu antibodi dapat mengikat banyak molekul biotin, maka sejumlah besar streptavidin berlabel dapat menempel pada antibodi tersebut. Hal ini meningkatkan sensitivitas dibandingkan teknik enzimatik sebelumnya dan memungkinkan penggunaan antibodi primer dengan pengenceran yang lebih tinggi. Namun, pada jaringan dengan kandungan biotin endogen yang tinggi, seperti hati dan ginjal, perlu dilakukan blokade avidin/biotin terlebih dahulu sebelum pemberian antibodi primer agar hasil pewarnaan lebih spesifik. (Grizzle et al., 2007).

## DAFTAR PUSTAKA

- Grizzle, W. E., Fredenburgh, J. L., & Myers, R. B. (2007). Fixation of Tissues. In *Theory and Practice of Histological Techniques, Sixth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-10279-0.50011-7>
- Harms, P. W., Frankel, T. L., Moutafi, M., Rao, A., Rimm, D. L., Taube, J. M., Thomas, D., Chan, M. P., & Pantanowitz, L. (2023). Multiplex Immunohistochemistry and Immunofluorescence: A Practical Update for Pathologists. *Modern Pathology*, 36(7). <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100197>
- Hawes, D., Shi, S.-R., Dabbs, D. J., Taylor, C. R., & Cote, R. J. (2020). Immunohistochemistry as a laboratory test. *Immunohistochemistry, January*, 48-70.
- Janardhan, K. S., Jensen, H., Clayton, N. P., & Herbert, R. A. (2018). Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicologic Pathology*, 46(5), 488-510. <https://doi.org/10.1177/0192623318776907>
- Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50(6), 411-418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 289-298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405-426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

# BAB

# 9

# PROTOKOL IMUNOHISTOKIMIA

dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed.

## A. Pendahuluan

Protokol imunohistokimia (IHK) merupakan serangkaian prosedur standar yang dirancang untuk mendeteksi dan memvisualisasikan keberadaan antigen tertentu dalam jaringan melalui ikatan spesifik antara antigen dan antibodi. Protokol ini mencakup tahapan persiapan sampel, deparafinisasi, pemulihan antigen, proses blocking, inkubasi antibodi primer dan sekunder, hingga visualisasi menggunakan sistem deteksi tertentu. Dengan demikian, protokol IHK berfungsi sebagai pedoman praktis yang mengintegrasikan prinsip dasar imunologi dengan teknik histologi, sehingga memungkinkan pengamatan morfologi jaringan sekaligus ekspresi molekuler di dalamnya (Nurchayati and Kusmardi, 2024).

Standarisasi protokol IHK menjadi hal yang sangat penting karena hasil pewarnaan sangat bergantung pada faktor teknis, seperti lama fiksasi, jenis buffer antigen retrieval, konsentrasi antibodi, hingga metode deteksi yang digunakan. Penerapan standar memastikan hasil yang diperoleh bersifat valid, reliabel, dan reproduksibel sehingga dapat dibandingkan secara luas, baik dalam penelitian maupun praktik diagnostik.

Meskipun demikian, penerapan protokol IHK sangat bervariasi. Perbedaan ini dipengaruhi oleh karakteristik antigen yang ditargetkan, jenis dan sumber antibodi yang digunakan, serta sistem deteksi yang dipilih, baik konvensional maupun

modern. Oleh karena itu, protokol IHK terkini terus dikembangkan dalam bentuk panduan yang lebih terstruktur, jelas, dan komprehensif, sehingga dapat membantu peneliti maupun klinisi mencapai tujuan riset dan diagnosis dengan lebih cepat serta akurat.

## **B. Prinsip Umum Protokol IHK**

Prosedur imunohistokimia memanfaatkan interaksi spesifik antara antigen dan antibodi. Antibodi primer menempel pada protein target dalam jaringan, kemudian pada metode indirektdi antibodi sekunder dari spesies berbeda mengenali antibodi primer untuk memperkuat sinyal pewarnaan. Visualisasi ikatan ini dilakukan menggunakan sistem enzim-substrat, seperti HRP-DAB, atau penanda fluoresen, sehingga lokasi dan ekspresi protein dapat diamati secara jelas di bawah mikroskop.

Validitas hasil IHK dijamin dengan penggunaan kontrol positif, yakni jaringan yang diketahui mengekspresikan antigen, dan kontrol negatif, di mana antibodi primer sengaja tidak ditambahkan, sehingga pewarnaan spesifik dapat dibedakan dari latar nonspesifik. Mutu pewarnaan sangat dipengaruhi oleh teknik fiksasi, prosedur antigen retrieval, blocking, konsentrasi antibodi, serta sistem deteksi yang digunakan. Oleh karena itu, penerapan protokol yang baku dan konsisten sangat penting agar hasil IHK akurat, reproduibel, dan dapat dibandingkan antar penelitian maupun praktik diagnostik.

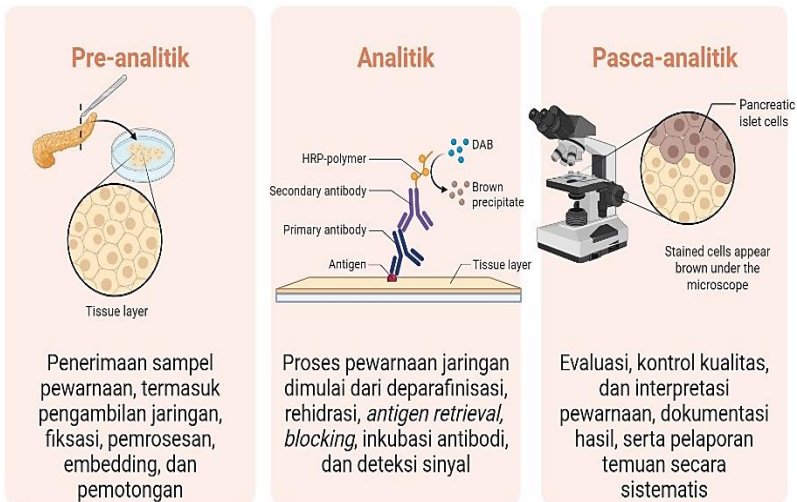
## **C. Tahapan Protokol Imunohistokimia Umum**

Secara garis besar, protokol IHK tersusun atas tiga kerangka utama (Gambar 9.1), yaitu pre-analitik (tahap persiapan jaringan), analitik (tahap inti pewarnaan), dan pasca-analitik (evaluasi hasil serta validasi kontrol). Ketiganya saling terkait erat dan sama-sama menentukan keberhasilan akhir pemeriksaan IHK.

## 1. Pre-analitik

Tahap pre-analitik imunohistokimia dimulai dengan pemilihan jaringan, baik dari biopsi maupun hasil reseksi bedah, yang segera difiksasi menggunakan larutan 10% *neutral buffered formalin* (NBF) dengan pH sekitar 7,0. Fiksasi bertujuan mempertahankan morfologi sel dan antigen, sekaligus mencegah autolisis. Potongan jaringan sebaiknya berukuran 3–5 mm agar penetrasi fiksatif optimal.

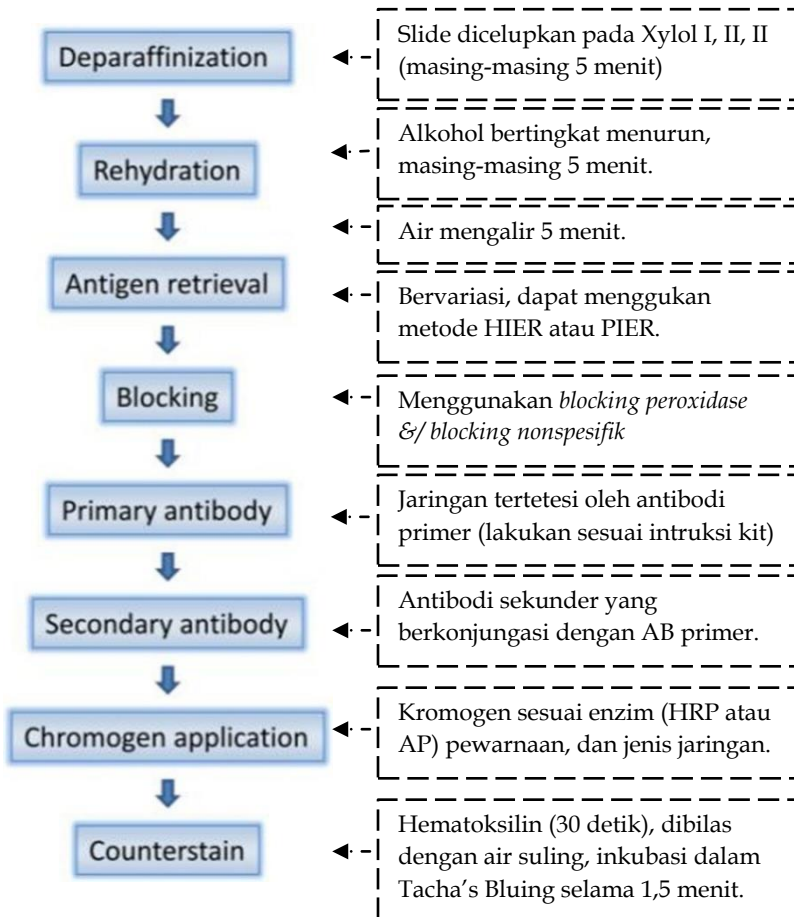
Jaringan difiksasi dengan formalin, kemudian di-embedding dalam parafin untuk menghasilkan blok FFPE (*formalin-fixed paraffin-embedded*). Kemudian blok parafin, dibuat irisan tipis dengan ketebalan 3–5  $\mu\text{m}$  menggunakan mikrotom, kemudian ditempatkan pada slide kaca dengan daya adhesi tinggi, seperti slide berlapis *Poly-L-lysine*, APES, atau slide adhesif khusus untuk IHK. Potongan jaringan dikeringkan pada suhu 56–60 °C selama  $\pm 1$  jam, atau 12–24 jam pada suhu ruangan, untuk memastikan jaringan menempel kuat selama proses deparafinisasi dan pewarnaan (Meliniawati and Wiryanti, 2015).



**Gambar 9.1** Prosedur imunohistokimia, diadaptasi dari (Biotechne, 2025), menggunakan Biorender©.

## 2. Analitik

Proses pewarnaan imunohistokimia, misalnya pada pemeriksaan marker reseptor hormon seperti HER2 atau ER, dapat dilakukan secara manual menggunakan teknik konvensional di laboratorium (Gambar 9.2), maupun secara otomatis dengan bantuan alat *auto-stainer*. Tahapan utama yang dilalui mencakup deparafinisasi untuk menghilangkan parafin dari jaringan, antigen retrieval guna memulihkan epitope yang terdenaturasi akibat fiksasi, serta blocking untuk mencegah ikatan nonspesifik. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen target, diikuti antibodi sekunder dan sistem deteksi yang sesuai. Akhirnya, hasil reaksi divisualisasikan melalui pewarnaan kromogen, biasanya dengan DAB, sehingga ekspresi antigen dapat diamati secara mikroskopis.



**Gambar 9.2** Tahapan analitik imunohistokimia standar, diadaptasi dari (Magaki *et al.*, 2019).

### *Deparaffinisasi*

Jaringan pada slide terlebih dahulu dibersihkan dari parafin menggunakan xylol atau dimetilbenzena secara berulang, biasanya 2-3 kali, masing-masing beberapa menit. Tujuannya adalah menghilangkan parafin yang bersifat hidrofobik sehingga reagen berbasis air dapat menembus jaringan.

### ***Rehidrasi***

Selanjutnya, slide melewati tahap rehidrasi dengan pencelupan berurutan ke dalam seri alkohol dengan konsentrasi menurun (96%, 80%, dan 70%), masing-masing selama sekitar 5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir selama 5 menit. Tahap rehidrasi ini bertujuan untuk mengembalikan kelembaban jaringan sehingga kondisinya mendekati keadaan fisiologis.

### ***Inaktivasi Peroksidase Endogen***

Untuk mencegah pewarnaan nonspesifik, slide diinkubasi dalam larutan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) 3% yang biasanya dilarutkan dalam metanol selama 10–15 menit. Tahap ini penting karena banyak jaringan, terutama darah atau otot, mengandung enzim peroksidase endogen yang dapat bereaksi dengan substrat kromogen sehingga menghasilkan sinyal palsu.

### ***Antigen Retrieval***

Fiksasi dengan formalin cenderung menutupi epitope antigen melalui ikatan silang protein, sehingga perlu dilakukan antigen retrieval untuk membuka kembali situs ikatan antibodi. Metode yang paling umum adalah *Heat-Induced Epitope Retrieval* (HIER), menggunakan buffer seperti sitrat pH 6, Tris-EDTA pH 8–9, atau Tris basa pH 9,5–10. Antigen retrieval pada imunohistokimia dapat dilakukan dengan beberapa metode.

Metode pertama menggunakan *microwave*, yaitu setelah inaktivasi peroksidase endogen, slide dibilas dengan air deionisasi kemudian dipanaskan dalam buffer retrieval pada suhu 100 °C selama 5–10 menit. Setelah didinginkan selama 15 menit, slide kembali dibilas dua kali dengan air deionisasi dan dicuci menggunakan PBS. Metode kedua menggunakan *pressure cooker*, di mana slide dalam rak direndam buffer retrieval, lalu dipanaskan di *decloaking chamber* atau *pressure cooker* pada suhu 95 °C selama 30 menit dan 90 °C selama 10 detik. Setelah didinginkan selama

20–30 menit, slide dibilas dengan air deionisasi dan direndam dalam 0,1% TBS-Tween selama 5 menit. Metode lain meliputi *water bath*, dengan pemanasan slide dalam buffer retrieval selama 20–40 menit, dilanjutkan pendinginan 20 menit, pembilasan dengan air deionisasi, dan pencucian PBS. Pemilihan pH buffer sangat menentukan, karena beberapa antibodi bekerja optimal pada kondisi asam, sementara yang lain pada kondisi basa.

Alternatif berikutnya adalah *Proteolytic-Induced Epitope Retrieval* (PIER), yang menggunakan enzim proteolitik (misalnya proteinase K, trypsin, atau pepsin) yang diinkubasikan selama 5–15 menit pada suhu 37 °C, kemudian segera dihentikan dengan air deionisasi dingin dan dicuci PBS. Pemilihan metode sangat bergantung pada jenis antigen, jaringan, dan antibodi yang digunakan, sehingga optimasi kondisi merupakan langkah penting untuk memperoleh hasil pewarnaan yang spesifik dan optimal.

### ***Blocking Nonspesifik***

Untuk mencegah ikatan nonspesifik antibodi, jaringan ditetesi serum normal (misalnya serum kambing, kelinci, atau bovine serum albumin 5%) ke jaringan dan diinkubasi selama 15–30 menit pada suhu ruang. Blocking ini menutupi situs pengikatan nonspesifik dan mengurangi background. Pada laboratorium yang menggunakan kit komersial, tahapan blocking peroxidase dan blocking nonspesifik dapat digabung dalam satu langkah sesuai instruksi kit.

### ***Inkubasi Antibodi Primer***

Slide diinkubasi dengan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen target. Inkubasi dapat dilakukan 30–60 menit pada suhu ruang atau semalam pada suhu 4 °C untuk meningkatkan ikatan spesifik. Setelah inkubasi, slide dibilas dengan PBS agar antibodi bebas tidak tertinggal.

### ***Inkubasi Antibodi Sekunder***

Langkah berikutnya adalah menambahkan antibodi sekunder yang berikatan dengan antibodi primer. Antibodi sekunder biasanya terkonjugasi dengan biotin, yang kemudian akan diikat oleh streptavidin-peroksidase (streptavidin-HRP). Pada beberapa kit IHK modern, antibodi sekunder dan enzim pendeteksi sudah dikombinasikan dalam satu reagen siap pakai, sehingga prosedur lebih sederhana.

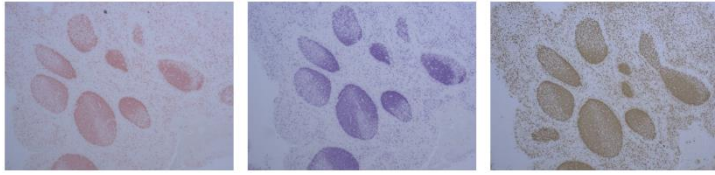
### ***Inkubasi dengan Streptavidin-Peroksidase***

Slide ditetesi larutan streptavidin-HRP (sekitar 100–150 µl per slide) dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, cuci slide dengan larutan PBS pH 7,2–7,4. Catatan: Beberapa kit IHK modern telah menggabungkan langkah antibodi sekunder dan streptavidin-HRP ke dalam satu sistem deteksi, sehingga tahap ini dapat dilewati sesuai jenis kit yang digunakan.

### ***Visualisasi dengan Kromogen (Staining)***

Substrat kromogen yang umum digunakan adalah 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Setelah ditetesi HRP, DAB akan dioksidasi membentuk endapan coklat yang dapat dilihat dengan mikroskop cahaya. Inkubasi kromogen berlangsung beberapa menit (umumnya 5–10 menit), dengan pemantauan di bawah mikroskop agar intensitas pewarnaan tidak berlebihan.

Selain DAB, terdapat beberapa alternatif kromogen yang dapat digunakan sesuai kebutuhan eksperimen. AEC (*3-Amino-9-ethylcarbazole*) menghasilkan endapan merah dan larut dalam air, sehingga perlu mounting dengan media berair. VIP (Vector® VIP) memberikan warna ungu gelap yang tahan lama. BCIP/NBT digunakan untuk deteksi alkalis fosfatase (AP) dan menghasilkan warna biru hingga ungu. Sementara itu, Fast Red dan Fast Blue juga untuk deteksi AP, menghasilkan warna merah atau biru yang jelas dan kontras (Gambar 9.3).



**Gambar 9.3** Ki-67 pada tonsil manusia FFPE dengan deteksi EverRed, EverBlue, dan DAB; prosedur IHK standar; pengamatan dengan mikroskop EVOS M7000, lensa 4× (Fisher, 2021).

#### ***Counterstaining (Pewarnaan Latar)***

Slide dicelupkan ke dalam hematoksilin selama 30 detik untuk mewarnai inti sel biru, dibilas dengan air suling hingga jernih, kemudian didiamkan 2 menit. Selanjutnya, slide diinkubasi dalam *Tacha's Bluing* selama 1,5 menit untuk memperkuat pewarnaan, diikuti bilasan air suling hingga jernih dan didiamkan lagi 2 menit, sehingga morfologi jaringan menjadi lebih jelas.

#### ***Evaluasi Awal di Mikroskop***

Periksa preparat di bawah mikroskop untuk memastikan intensitas pewarnaan sesuai.

#### ***Dehidrasi, Clearing, dan Mounting***

Setelah pewarnaan selesai, slide dilewatkan ke dalam seri alkohol bertingkat naik untuk mengeluarkan air, kemudian dicelupkan ke xylol agar jaringan menjadi transparan. Tahap akhir adalah mounting menggunakan medium perekat, lalu ditutup dengan cover glass. Preparat yang sudah kering siap dievaluasi di bawah mikroskop.

### **3. Pasca-analitik**

Tahap pasca-analitik merupakan prosedur evaluasi dari hasil pewarnaan IHK yang sangat penting setelah tahap analitik selesai dilakukan. Pada fase ini, pemeriksa tidak hanya menilai ada atau tidaknya ekspresi antigen target, tetapi juga menelusuri kemungkinan kesalahan teknis yang dapat memengaruhi validitas interpretasi. Identifikasi kesalahan sejak dini membantu menjaga mutu hasil,

mencegah salah tafsir, dan menjadi dasar untuk perbaikan prosedur laboratorium.

Beberapa permasalahan umum yang sering ditemukan antara lain pewarnaan negatif atau lemah, background tinggi, serta berbagai artefak teknis. Penyebabnya dapat berhubungan dengan kualitas fiksasi jaringan, kondisi antibodi, optimalisasi antigen retrieval, pencucian dan blocking yang tidak adekuat, hingga masalah pada tahap mounting. Setiap masalah memerlukan penelusuran sistematis untuk menentukan faktor penyebab dan penanganan yang tepat.

Untuk mempermudah identifikasi dan perbaikan, ringkasan troubleshooting yang berisi kemungkinan penyebab dan solusi praktis disajikan pada Tabel 9.1

**Tabel 9.1** Koreksi permasalahan pulasan IHK

No	Faktor Penyebab	Solusi
<b>Pewarnaan lemah atau tidak ada</b>		
1	Jaringan tidak difiksasi dengan baik/over-fiksasi	Periksa pulasan H&E; optimalkan waktu fiksasi; lakukan antigen retrieval lebih lama
2	Konsentrasi antibodi terlalu rendah	Tingkatkan konsentrasi antibodi atau perpanjang waktu inkubasi
3	Antibodi rusak karena penyimpanan yang tidak tepat	Simpan antibodi sesuai rekomendasi (-20 °C atau 4 °C, hindari siklus beku-cair)
4	Antigen retrieval tidak optimal	Gunakan buffer retrieval sesuai rekomendasi (misalnya pH 6 atau pH 9)
5	Potongan jaringan mengering selama proses	Hindari pengeringan; lanjutkan pewarnaan segera setelah deparafinisasi

No	Faktor Penyebab	Solusi
<b>Background Tinggi / Pewarnaan Nonspesifik</b>		
1	Blocking enzim endogen tidak sempurna	Tambahkan blocking ( $H_2O_2$ untuk peroksidase, levamisole untuk fosfatase)
2	Konsentrasi antibodi terlalu tinggi	Lakukan titrasi antibodi untuk mendapatkan konsentrasi optimal
3	Pencucian tidak adekuat	Gunakan PBS/TBS segar dan perpanjang waktu pencucian
4	Inkubasi kromogen terlalu lama	Batasi waktu penggunaan DAB sesuai protokol
5	Biotin endogen tidak diblok	Lakukan avidin-biotin blocking atau gunakan sistem deteksi berbasis polimer
<b>Artefak Teknis</b>		
1	Tepi jaringan lebih gelap ( <i>edge effect</i> )	Pastikan pencucian cukup lama setelah inkubasi antibodi
2	Gelembung di bawah cover glass	Pasang cover glass hati-hati; bila ada gelembung, inkubasi di water bath 37 °C lalu ganti cover glass
3	Jaringan rontok dari slide	Gunakan slide berlapis perekat; optimalkan fiksasi dan penanganan jaringan
4	Inti hitam / terlalu gelap	Hindari mengeringkan slide sebelum mounting
5	Reagen menumpuk di jaringan	Pastikan distribusi reagen merata dan tidak berlebihan

(Boster, 2018)

Dalam melakukan analisis, setiap kesalahan teknis maupun masalah hasil pewarnaan harus didokumentasikan dalam buku kerja laboratorium, karena catatan tersebut berfungsi untuk mengetahui pola kesalahan yang berulang, menjadi dasar dalam optimasi protokol, sekaligus menjadi sumber pembelajaran pada saat pelatihan teknis, serta

mendukung sistem jaminan mutu laboratorium. Dengan evaluasi pasca analitik yang sistematis dan disertai pemecahan masalah yang tepat, kualitas hasil pewarnaan dapat terjaga dan interpretasi diagnostik menjadi lebih andal., laboratorium dapat menghasilkan pewarnaan IHK yang konsisten, reliabel, dan bernilai diagnostik tinggi.

#### **D. Variasi dan Adaptasi Protokol**

Prosedur imunohistokimia secara umum memiliki prinsip dasar yang serupa, penerapannya dapat bervariasi bergantung pada jenis sampel, fasilitas laboratorium, maupun tujuan analisis. Pada jaringan *frozen section*, antigen umumnya lebih terjaga karena tidak melalui proses fiksasi formalin dan parafinasi, sehingga tidak selalu memerlukan antigen retrieval. Kelemahannya adalah morfologi jaringan kurang terpelihara dibandingkan *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE), yang sebaliknya memberikan struktur jaringan lebih baik namun sering memerlukan optimasi antigen retrieval agar epitope terbuka kembali.

Prosedur IHK secara teknis dapat dilakukan secara manual maupun otomatis menggunakan autostainer. Metode manual lebih fleksibel dan ekonomis, tetapi sangat bergantung pada keterampilan operator sehingga rentan menimbulkan variasi antar slide. Sebaliknya, autostainer memungkinkan standardisasi tinggi, mengurangi kesalahan manusia, dan cocok untuk laboratorium dengan volume pemeriksaan besar, meskipun biayanya relatif lebih mahal.

Selain itu, sistem deteksi juga bervariasi. Pendekatan konvensional adalah menggunakan kromogen seperti DAB yang menghasilkan pewarnaan permanen dan dapat dievaluasi dengan mikroskop cahaya. Namun, untuk tujuan penelitian yang membutuhkan analisis multi parameter, digunakan metode imunofluoresensi, di mana antibodi diberi label fluorokrom. Teknik ini memungkinkan deteksi simultan beberapa antigen dalam satu sampel, meskipun hasilnya lebih

sulit disimpan dalam jangka panjang karena fluorokrom mudah pudar.

### **Kesimpulan**

Protokol imunohistokimia pada dasarnya mengikuti alur yang baku, mulai dari persiapan jaringan, inkubasi antibodi, hingga sistem deteksi. Namun, dalam praktiknya, setiap tahap sering kali membutuhkan optimasi sesuai jenis sampel, target antigen, dan reagen yang digunakan. Variasi dalam metode, baik pada pilihan jaringan, sistem manual atau otomatis, maupun jenis deteksi, mencerminkan fleksibilitas IHK sebagai teknik yang dapat disesuaikan dengan kebutuhan diagnostik maupun penelitian. Oleh karena itu, pemahaman prinsip dasar sekaligus keterampilan adaptasi sangat penting untuk menjamin hasil yang valid, konsisten, dan dapat diinterpretasikan secara andal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Biotechnne (2025) *VisUCyte™ HRP Polymer, R&D Systems*.
- Boster (2018) 'How to become an IHC expert in 4 days', pp. 1–42.
- Fisher, T. (2021) 'Immunohistochemistry: five steps to publication-quality images', pp. 1–6. Magaki, S. *et al.* (2019) 'An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, pp. 289–298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25.
- Meliniawati, S. P. and Wiryanti, W. (2022) 'Standarisasi Pendidikan Ahli Teknologi Laboratorium Medik Dalam Rangka Meningkatkan Kelulusan Uji Kompetensi Nasional', in *Efektivitas Netral Buffer Formalin untuk Pemeriksaan Lekosit Urin*, p. 302.
- Nurchayati, O. and Kusmardi (2024) 'Imunohistokimia pada Kanker Payudara: Teknik, Aplikasi, dan Implikasinya dalam Diagnostik dan Terapi.', *Majalah Pratista Patologi*, 9(2), pp. 185–97.

# BAB 10 | EVALUASI HASIL IMUNO-HISTOKIMIA

Dr. dr. Patricia Diana Prasetyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med.

## A. Pendahuluan

Imunohistokimia (IHK) merupakan metode yang efektif dan sudah banyak digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis dengan mengevaluasi ekspresi jenis protein spesifik di dalam sel dan jaringan. Adanya antigen spesifik pada preparat jaringan ini dapat dideteksi dengan menggunakan jenis antibodi spesifik, dan reaksi antigen-antibodi yang terbentuk ini dapat divisualisasikan dengan pemberian senyawa kromogen khusus, sehingga dapat dievaluasi di bawah mikroskop oleh seorang ahli patologi (Hawes et al., 2009; Fedchenko and Reifenrath, 2014).

Kualitas proses evaluasi maupun interpretasi hasil IHK ini berperan penting dalam penegakan diagnosis, pengambilan keputusan terapi, sampai penentuan prognosis, sehingga perlu dilakukan oleh ahli patologi yang berpengalaman, memiliki jam terbang tinggi, dan sudah terlatih untuk melakukan pembacaan hasil dari berbagai jenis pemeriksaan imunohistokimia spesifik. Selain itu, evaluasi hasil IHK umumnya akan dilakukan dengan mengkombinasikan metode kualitatif dan semi-kuantitatif untuk mengurangi risiko inkonsistensi antar-pemeriksa serta meningkatkan akurasi hasil interpretasi IHK (Hawes et al., 2009; Meyerholz and Beck, 2018).

Metode evaluasi IHK kualitatif hanya akan menilai ada atau tidaknya ekspresi suatu protein tertentu, sementara metode semi-kuantitatif akan menambahkan pemberian skor tertentu berdasarkan pada dua karakteristik utama, yaitu intensitas

pewarnaan dan proporsi sel atau jaringan yang terwarnai pada preparat. Saat ini sudah tersedia berbagai sistem skoring yang berbeda, baik yang dapat digunakan secara luas seperti skor H, maupun yang dibuat secara spesifik untuk jenis protein tertentu seperti skor Allred atau skor J (Kurosumi, 2007; Fedchenko and Reifenrath, 2014; Rai et al., 2020).

## **B. Faktor yang Mempengaruhi Hasil Imunohistokimia**

Ada sejumlah faktor yang diketahui dapat mempengaruhi hasil IHK, sehingga perlu dipertimbangkan oleh ahli patologi saat melakukan evaluasi dan menginterpretasikan hasil IHK, antara lain seperti (Taylor and Levenson, 2006; Hawes et al., 2009; Gown, 2016):

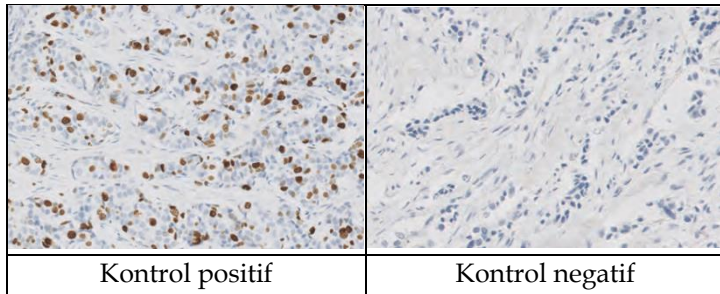
### **1. Teknik pembuatan dan pewarnaan preparat IHK**

Semua laboratorium patologi anatomi yang mengerjakan pemeriksaan IHK perlu membuat protokol khusus untuk mengatur berbagai proses yang terlibat dalam pembuatan sampai pewarnaan preparat IHK, sehingga pemeriksaan IHK dapat dilakukan secara konsisten dengan reproduksibilitas dan akurasi tinggi. Reagen maupun kit pemeriksaan yang digunakan juga harus diperbarui serta divalidasi secara berkala untuk menjaga kualitasnya.

### **2. Penggunaan kontrol positif dan negatif**

Proses pembacaan dan interpretasi hasil IHK memerlukan kontrol positif berupa sampel jaringan yang diketahui dapat mengekspresikan antigen spesifik yang akan diperiksa, serta kontrol negatif berupa bagian spesimen yang diperiksa tanpa pemberian antibodi (diganti dengan cairan pengencer atau antibodi lain yang tidak sedang diperiksa). Pada kontrol positif, pewarnaan hanya ditemukan pada sel yang diketahui dapat mengekspresikan antigen, sementara sel dan struktur lain pada preparat tersebut nampak tidak terwarnai. Pada kontrol negatif, seharusnya tidak ditemukan adanya pewarnaan. Evaluasi hasil IHK ini dianggap tidak valid tanpa adanya kontrol positif dan negatif sebagai pembanding. Penggunaan kontrol bermanfaat untuk

menentukan ada atau tidak adanya reaksi serta menilai karakteristik reaksi seperti intensitas dan lokalisasi.



**Gambar 10.1** Contoh kontrol positif dan negatif untuk menilai marker Ki-67 pada kasus tumor payudara.

### 3. Kemungkinan hasil negatif atau positif palsu

Terdapat sejumlah faktor yang dapat menyebabkan hasil negatif atau positif palsu pada pemeriksaan IHK, antara lain seperti adanya artefak teknis berupa sel tumor yang rusak atau tidak utuh (hasil positif palsu atau non-spesifik) atau area nekrotik yang non-viabel dan mengalami kebocoran protein serum (positif palsu). Sementara itu, hasil negatif palsu dapat disebabkan oleh masalah fiksasi preparat dan kurangnya optimalisasi atau kalibrasi antibodi sehingga konsentrasinya menjadi terlalu rendah,

Saat ahli patologi menemukan pola pewarnaan yang abnormal, maka hasil dapat diabaikan, dan pembacaan perlu diulang. Untuk dapat menginterpretasikan hasil IHK dengan efektif, ahli patologi harus sepenuhnya mengetahui pola pewarnaan normal dari antibodi primer yang diperiksa, termasuk spesifisitas jaringan maupun lokasi subseluler nya. Laboratorium juga perlu memiliki kriteria spesifik untuk menentukan dan melaporkan hasil positif atau negatif pada berbagai tipe IHK, terutama untuk tipe yang dapat mewarnai membran sel, sitoplasma, inti sel, dan area ekstraseluler. Hasil IHK hanya dapat dilaporkan positif bila pewarnaan ditemukan pada area seluler atau jaringan yang seharusnya.

### C. Interpretasi Hasil Imunohistokimia

Tujuan utama pemeriksaan IHK adalah memvisualisasikan protein atau antigen target spesifik pada jaringan, sembari tetap mempertahankan konteks spasial dari arsitektur jaringan secara keseluruhan. Analisis hasil IHK dapat dilakukan secara manual dengan mikroskop cahaya atau mikroskop fluoresensi sesuai tipe pewarnaan yang digunakan, atau dilakukan secara otomatis dengan bantuan program komputer (Gown, 2016; Kim, Roh and Park, 2016).

Pemeriksaan IHK tidak memiliki standar normal atau konvensional sebagai rujukan seperti pada metode pemeriksaan lain, terutama karena pemeriksaan ini pada dasarnya hanya bertujuan untuk mendeteksi ada atau tidaknya ekspresi antigen spesifik. Hasil IHK akan diinterpretasikan berdasarkan ada atau tidaknya antigen disertai dengan pola ekspresinya, lalu hasil dapat dipertimbangkan lebih lanjut sesuai konteks klinis dari masing-masing kasus maupun jenis penanda atau marker IHK spesifik yang diperiksa (Taylor and Levenson, 2006; Gown, 2016; Kim, Roh and Park, 2016).

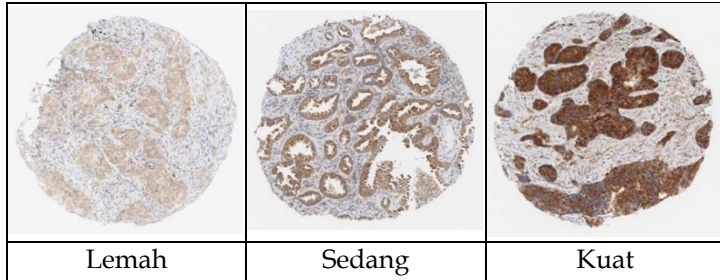
Beberapa elemen utama yang perlu dipertimbangkan oleh ahli patologi saat menganalisis hasil IHK untuk dapat menarik kesimpulan secara akurat meliputi:

#### 1. Intensitas pewarnaan

Penilaian ada atau tidak adanya reaktivitas pada preparat IHK dapat dipengaruhi oleh luasnya pewarnaan, intensitas pewarnaan, atau kombinasi keduanya. Intensitas pewarnaan dapat dinilai dengan menggunakan kontrol positif sebagai rujukan atau pembanding dan secara umum dapat dibagi menjadi kategori intensitas lemah (tidak ada antigen atau jumlah antigen sangat sedikit), sedang (jumlah antigen sedang) dan kuat (jumlah antigen sangat banyak).

Intensitas pewarnaan sendiri dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, mulai dari kualitas reagen, antibodi primer, sampai pilihan bahan pengencer sesuai protokol IHK. Selain itu, untuk menghasilkan sinyal pewarnaan dengan intensitas yang kuat, sangat penting untuk mengurangi pewarnaan

bagian latar belakang pada preparat dengan menggunakan reagen deteksi khusus (Walker, 2006; Meyerholz and Beck, 2018; Wen et al., 2024).



**Gambar 10.2** Perbandingan intensitas pewarnaan pada IHK.

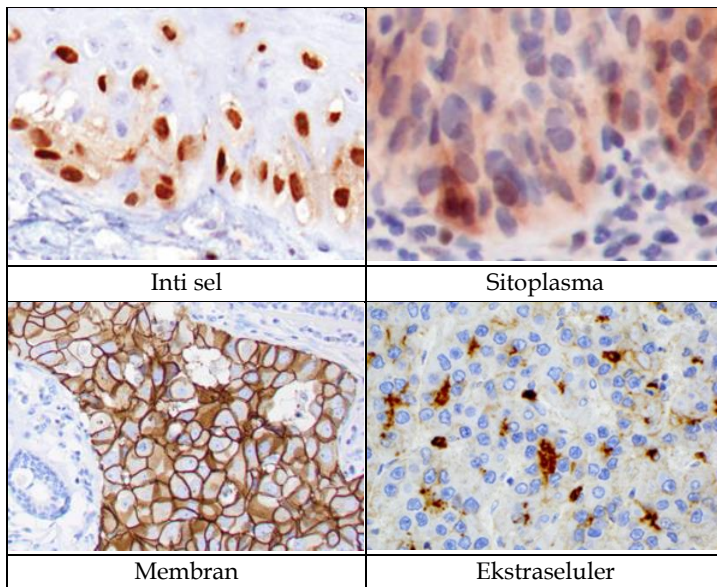
## 2. Lokasi pewarnaan

Pemeriksaan IHK dapat digunakan untuk mengevaluasi target sembari mempertahankan konteks spasial jaringan, yaitu dengan melihat apakah pewarnaan ditemukan di lokasi (tipe sel maupun kompartemen subseluler) yang sesuai. Hasil positif tidak hanya ditentukan oleh adanya pewarnaan, namun juga oleh lokasinya. Pewarnaan positif di lokasi yang tidak sesuai akan dianggap sebagai hasil yang tidak valid atau negatif. Lokasi pewarnaan ini juga dapat memberikan informasi tambahan terkait lokalisasi protein di dalam jaringan. Perlu diingat pula bahwa ada beberapa jenis antigen yang dapat menunjukkan perbedaan pola ekspresi sesuai dengan fase siklus atau stadium diferensiasi sel, misalnya ekspresi imunoglobulin di jaringan limfoid atau jenis tumor tertentu (Walker, 2006; Tuffaha, Guski and Kristiansen, 2018).

Lokasi pewarnaan atau pola reaktivitas IHK yang utama adalah:

- a. **Pewarnaan inti sel:** menunjukkan ekspresi protein di dalam inti sel atau membran inti, umumnya ditemukan pada pemeriksaan IHK untuk jenis faktor transkripsi atau protein terikat DNA, misalnya seperti p53 dan Ki-67, serta ekspresi reseptor hormon steroid.

- b. **Pewarnaan sitoplasma:** menunjukkan ekspresi protein di dalam sitoplasma, umumnya berhubungan dengan adanya enzim metabolik, molekul pengiriman sinyal, atau jenis protein struktural sel seperti sitokeratin, aktin, desmin dan vimentin. Selain itu, ada beberapa antigen yang memiliki pola pewarnaan sitoplasma restriktif dan menunjukkan pewarnaan pada organel spesifik saja, misalnya mitokondria (pola sitoplasma granularis) atau aparatus Golgi (pola perinuklear unilateral).
- c. **Pewarnaan membran:** menunjukkan ekspresi protein di membran sel, umumnya ditemukan pada pemeriksaan IHK untuk berbagai jenis reseptor, protein pengangkut, atau molekul perlekatan, misalnya seperti HER2 dan sebagian besar antigen CD, termasuk CD20, CD28, dan lainnya.
- d. **Pewarnaan ekstraseluler:** menunjukkan adanya antigen di area ekstraseluler dan matriks jaringan, serta pada antigen berupa produk sekresi sel seperti kolagen dan glikoprotein permukaan sel *Carcinoembryonic antigen* (CEA).

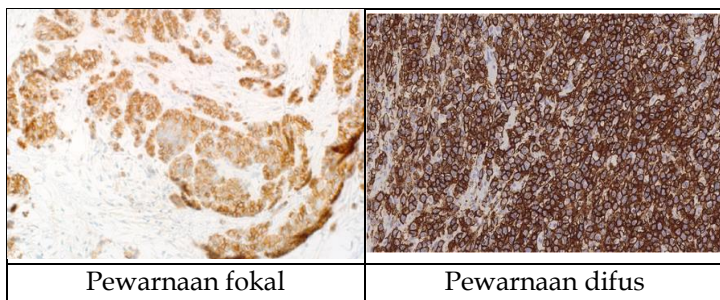


**Gambar 10.3** Perbandingan lokasi pewarnaan pada IHK.

### 3. Pola pewarnaan

Pola pewarnaan secara umum dapat dibagi menjadi fokal (pewarnaan di area dengan luas terbatas atau hanya pada sejumlah kecil sel, yaitu antara 10–50% sel) dan difus (area pewarnaan luas dan mencakup hampir seluruh permukaan jaringan tumor, yaitu sampai >75% sel).

Interpretasi pola pewarnaan ini dianggap penting karena pewarnaan difus sering dianggap sebagai hasil positif secara definitif, sementara tipe pewarnaan fokal dapat dianggap positif, meragukan atau negatif sesuai jenis antigen spesifik yang diperiksa dan konteks klinisnya. Pola pewarnaan juga dapat memberikan informasi terkait distribusi dan jumlah antigen yang bermanfaat untuk menegakkan diagnosis pada jenis kanker atau penyakit tertentu. Proporsi atau persentase jumlah sel yang terwarnai juga dapat digunakan untuk metode evaluasi IHK semi-kuantitatif (Kakar et al., 2015; Tuffaha, Guski and Kristiansen, 2018).



**Gambar 10.4** Perbandingan pewarnaan IHK fokal dan difus.

#### D. Analisis Hasil Imunohistokimia

Hasil pemeriksaan IHK umumnya perlu diinterpretasikan dan dianalisis lebih lanjut supaya dapat digunakan secara klinis untuk penegakan diagnosis, menentukan potensi manfaat terapi untuk pembuatan keputusan terapi, atau penentuan prognosis. Data hasil pemeriksaan IHK ini secara umum dapat dinilai secara kualitatif atau secara semi-kuantitatif sesuai dengan jenis marker atau antigen yang diperiksa.

## 1. Metode Penilaian Kualitatif

Metode yang paling sederhana dan secara umum akan mengklasifikasikan hasil IHK sebagai positif bila ditemukan adanya ekspresi antigen yang diperiksa, dan negatif bila tidak ditemukan adanya ekspresi antigen. Metode kualitatif ini memiliki sejumlah kekurangan, termasuk subjektivitas dan variabilitas yang relatif tinggi karena penentuan hasil akan dipengaruhi oleh pengalaman serta pendapat pribadi dari ahli patologi yang menginterpretasikan hasil IHK. Selain itu, juga dapat dipertimbangkan penggunaan metode semi-kuantitatif dengan skoring untuk mempertajam hasil penilaian kualitatif (Walker, 2006; Fedchenko and Reifenrath, 2014; Kim, Roh and Park, 2016).

Meski secara umum dapat bermanfaat untuk keperluan diagnostik, jenis penilaian kualitatif tidak dapat memberikan informasi terkait tingkat ekspresi protein secara objektif. Oleh karena itu, penilaian hasil IHK dapat dikombinasikan dengan metode penilaian kuantitatif untuk menganalisis tingkat ekspresi protein atau jumlah sel reaktif secara objektif, misal dengan bantuan program analisis preparat otomatis, atau dengan menggunakan teknik pemeriksaan kuantitatif lanjut seperti *fluorescence in situ hybridization* (FISH) (Agersborg et al., 2018; Deng, Cai and Wang, 2025).

## 2. Metode Skoring Semi-Kuantitatif

Sistem skoring ini merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk penilaian reaktivitas IHK, terutama untuk pemeriksaan jenis marker atau antigen terkait pengambilan keputusan terapi dan potensi manfaat dari terapi. Metode ini mengkombinasikan penilaian ada atau tidaknya sel reaktif, penghitungan jumlah dan persentase sel reaktif, serta intensitas pewarnaan.

Proporsi jumlah sel reaktif dinilai dengan menghitung persentase jumlah sel reaktif tiap 1000 sel atau menghitung jumlah sel reaktif total di 10 lapangan pandang besar (LPB). Selanjutnya, akan diberikan skor tertentu menurut kisaran

persentase jumlah sel reaktif, misalnya pada CD20 yang diberikan skor mulai dari 0 (0–25% positif), 1 (25–50% positif), 2 (25–75% positif), 3 (75–90% positif), sampai 4 (90–100% positif). Selain itu, persentase jumlah sel reaktif juga dapat digunakan secara langsung tanpa diberikan skor, misalnya pada penentuan potensi manfaat terapi berdasarkan marker Ki-67 pada kanker payudara, yang langsung akan dibagi menjadi hasil negatif bila proporsi sel reaktif <20% dan positif bila  $\geq 20\%$  (Walker, 2006; Miyoshi et al., 2012; Kim, Roh and Park, 2016).

Penilaian intensitas pewarnaan preparat yang digunakan untuk penghitungan skor secara semi-kuantitatif juga relatif beragam, namun umumnya akan diberikan skor dari 0 – 3, yang masing-masing mewakili pewarnaan negatif (0), positif lemah (1+), positif sedang (2+) dan positif kuat (3+). Berbagai parameter ini akan dikombinasikan dengan rumus tertentu sesuai jenis antigen IHK untuk menghitung skor akhir sebagai metode interpretasi hasil IHK (Walker, 2006; Kim, Roh and Park, 2016; Goldsmith et al., 2024).

Pedoman khusus yang saat ini sudah banyak digunakan sebagai standar baku emas untuk metode penghitungan skor IHK semi-kuantitatif baru tersedia untuk beberapa jenis antigen saja, antara lain seperti *human epidermal growth receptor 2* (HER2), *estrogen receptor* (ER), *progesterone receptor* (PR), PD-L1, dan Ki-67, terutama untuk menentukan apakah pasien memenuhi kriteria untuk memperoleh jenis terapi tertentu. Berbagai sistem skoring ini dikembangkan untuk mengevaluasi intensitas serta distribusi pewarnaan IHK secara objektif, sehingga hasil IHK dapat dinilai secara konsisten dan akurat. Metode skoring yang digunakan ini juga dapat bervariasi menurut jenis marker atau antigen yang diperiksa (Goldsmith et al., 2024).

Beberapa jenis sistem skoring spesifik yang saat ini umum digunakan untuk mengevaluasi hasil IHK tersebut antara lain:

**a. H-score (Skor Histokimia)**

Skor dihitung berdasarkan kombinasi dari intensitas pewarnaan dan persentase sel positif atau reaktif yang awalnya dibuat untuk pemeriksaan ER, meski saat ini juga dapat digunakan untuk jenis antigen lain. Sayangnya, metode ini memerlukan waktu yang terlalu lama untuk memperoleh hasil akurat, sehingga sudah banyak digantikan oleh sistem skoring lain (Wen et al., 2024).

Cara penghitungan skor H: Pertama-tama, dilakukan penilaian intensitas pewarnaan membran (0, 1+, 2+, atau 3+) untuk tiap sel di lapangan pandang tertentu, dan dilanjutkan dengan penghitungan persentase sel pada masing-masing tingkat intensitas pewarnaan. Skor lalu dihitung menggunakan rumus:

$$\sum [1 \times (\% \text{ sel } 1+) + 2 \times (\% \text{ sel } 2+) + 3 \times (\% \text{ sel } 3+)]$$

dengan skor total antara 0 sampai 300. Interpretasi hasil IHC berdasarkan skor ini ditentukan menurut standar spesifik untuk masing-masing jenis antigen. Pada sistem ini, sel positif <1% dianggap sebagai hasil negatif (Fedchenko and Reifenrath, 2014; Wen et al., 2024).

**b. Skor Allred**

Serupa dengan skor H, skor dihitung berdasarkan kombinasi dari intensitas pewarnaan dan persentase sel positif atau reaktif. Skor kategori proporsi sel positif dibagi menjadi enam, mulai dari 0, 1 (<1%), 2 (1-10%), 3 (11-33%), 4 (34-66%), sampai 5 ( $\geq 67\%$ ), sementara skor kategori intensitas dibagi menjadi 4, mulai dari 0, 1 (lemah), 2 (sedang) sampai 3 (kuat). Skor akhir dihitung dengan menjumlahkan skor dari kedua kategori, dengan rumus:

$$\text{Skor total} = \text{Skor proporsi} + \text{Skor intensitas}$$

dengan skor total berkisar antara 0-8 (Rai et al., 2020). Interpretasi skor total ini umumnya dikaitkan dengan potensi efek terapi hormon, dengan skor 0-1 dianggap negatif dan menunjukkan tidak ada manfaat dari terapi hormon, sementara skor 2-8 dianggap positif, dengan potensi manfaat berbeda-beda menurut besarnya skor, mulai dari potensi rendah (20%) untuk skor 2-3, sedang (50%) untuk skor 4-6, dan tinggi (75%) untuk skor 7-8 (Allred, 1990).

**c. Skor J**

Sistem skoring ini hanya menggunakan jumlah sel positif tanpa mempertimbangkan intensitas pewarnaan. Skor di bagi menjadi 4, mulai dari 0 (tidak ada sel yang terwarnai), 1 (sel reaktif  $\geq 1\%$ ), 2 (sel reaktif  $>1\%$  namun masih  $<10\%$ ), sampai 3 (sel reaktif  $\geq 10\%$ ). Interpretasi akan ditentukan menurut skor ini, yaitu negatif untuk skor 0, meragukan (*equivocal*) untuk skor 1 dan 2, serta positif untuk skor 3 (Kurosumi, 2007).

**d. Skor Imunoreaktif (IRS)**

Sistem skoring yang menggabungkan hasil penilaian intensitas pewarnaan dan proporsi sel reaktif. Intensitas diberikan skor mulai dari 0 (tidak terwarnai), 1 (rendah), 2 (sedang), sampai 3 (kuat), sementara proporsi sel yang reaktif diberikan skor mulai dari 0, 1 ( $<10\%$ ), 2 (10-50%), 3 (51-80%), sampai 4 ( $>80\%$ ). Skor akhir dihitung dengan rumus:

$$\text{Skor total} = \text{Skor proporsi} \times \text{Skor intensitas}$$

dengan skor total berkisar antara 0 sampai 12. Hasil diinterpretasikan sebagai negatif bila skor total  $<8$  poin dan positif bila skor  $\geq 8$  poin (Mitachi et al., 2021).

## DAFTAR PUSTAKA

- Agersborg, S. et al. (2018) Immunohistochemistry and alternative FISH testing in breast cancer with HER2 equivocal amplification. *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(2), pp. 321–328.
- Allred, D.C. (1990) Immunocytochemical Analysis of Estrogen Receptors in Human Breast Carcinomas. *Archives of Surgery*, 125(1), p. 107.
- Deng, Y., Cai, B. and Wang, X. (2025) A fully automated quantitative analysis method based on deep learning algorithms for immunohistochemical staining expression intensities. *Intelligent Oncology*, 1(3), pp. 256–264.
- Fedchenko, N. and Reifenrath, J. (2014) Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology*, 9(1), p. 221.
- Goldsmith, J.D. et al. (2024) Principles of Analytic Validation of Immunohistochemical Assays: Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 148(6), pp. e111–e153.
- Gown, A.M. (2016) Diagnostic Immunohistochemistry: What Can Go Wrong and How to Prevent It. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 140(9), pp. 893–898.
- Hawes, D. et al. (2009) Immunohistochemistry. In: *Modern Surgical Pathology*. Elsevier, pp. 48–70.
- Kakar, S. et al. (2015) Immunohistochemical pitfalls in the diagnosis of hepatocellular adenomas and focal nodular hyperplasia: accurate understanding of diverse staining patterns is essential for diagnosis and risk assessment. *Modern Pathology*, 28(1), pp. 159–160.
- Kim, S.-W., Roh, J. and Park, C.-S. (2016) Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50(6), pp. 411–418.

- Kurosumi, M. (2007) Immunohistochemical assessment of hormone receptor status using a new scoring system (J-score) in breast cancer. *Breast Cancer*, 14(2), pp. 189–193.
- Meyerholz, D.K. and Beck, A.P. (2018) Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Laboratory Investigation*, 98(7), pp. 844–855.
- Mitachi, K. et al. (2021) Novel candidate factors predicting the effect of S-1 adjuvant chemotherapy of pancreatic cancer. *Scientific Reports*, 11(1), p. 6541.
- Miyoshi, H. et al. (2012) Comparison of CD20 expression in B-cell lymphoma between newly diagnosed, untreated cases and those after rituximab treatment. *Cancer Science*, 103(8), pp. 1567–1573.
- Rai, P. et al. (2020) Comparison of various scoring systems by immunohistochemistry for evaluating hormone receptors (Estrogen receptor and progesterone receptor) in carcinoma of breast. *Journal of Datta Meghe Institute of Medical Sciences University*, 15(2), p. 202.
- Taylor, C.R. and Levenson, R.M. (2006) Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 49(4), pp. 411–424.
- Tuffaha, M.S.A., Guski, H. and Kristiansen, G. (2018) Immunohistochemistry in Tumor Diagnostics. In: *Immunohistochemistry in Tumor Diagnostics*. Cham: Springer International Publishing, pp. 1–9.
- Walker, R.A. (2006) Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*, 49(4), pp. 406–410.
- Wen, Z. et al. (2024) Deep Learning-Based H-Score Quantification of Immunohistochemistry-Stained Images. *Modern Pathology*, 37(2), p. 100398.

# BAB 11

## APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA DI BIDANG PATOLOGI ANATOMI

dr. Meta Zulyati Oktora, Sp.PA., M.Biomed.

### A. Pendahuluan

Histokimia dan imunohistokimia (IHK) merupakan dua teknik utama dalam patologi anatomi yang berperan penting dalam menilai struktur, fungsi, serta perubahan molekuler pada jaringan. Histokimia digunakan untuk mengidentifikasi komponen kimia tertentu, seperti karbohidrat, lemak, protein, pigmen, maupun enzim, melalui pewarnaan spesifik yang menampilkan karakteristik khas jaringan. Sebaliknya, IHK bekerja berdasarkan interaksi antigen-antibodi sehingga mampu mendeteksi antigen tertentu dalam sel atau jaringan, memberikan informasi lebih detail terkait tipe sel, tingkat diferensiasi, hingga potensi respon terhadap terapi.

Dalam beberapa dekade terakhir, penggunaan IHK berkembang pesat seiring dengan hadirnya teknologi baru, seperti *epitope retrieval*, pemakaian antibodi monoklonal yang semakin spesifik, otomatisasi prosedur, serta integrasi dengan metode molekuler. Yigzaw et al. (2024) melaporkan bahwa IHK kini tidak hanya berfungsi untuk diagnosis, tetapi juga bermanfaat dalam memprediksi respons terapi dan menilai prognosis, serta diperkirakan akan semakin erat terhubung dengan patologi molekuler di masa depan sehingga memperkuat perannya dalam kedokteran presisi.

Histokimia juga mengalami perkembangan, terutama dalam hal teknik pewarnaan dan persiapan jaringan, dengan adanya peningkatan standar praktik. Golberg, Wysiadecki, dan

kolega (2024) maninjau peran histo kimia dalam riset anatomi, termasuk prosedur pengambilan sampel, fiksasi, embedding, pembedahan, hingga pewarnaan dan evaluasi kualitas jaringan.

Kedua metode tersebut kini menjadi penghubung penting antara morfologi klasik dan patologi molekuler. Dalam praktiknya, IHK sering dikombinasikan dengan teknik seperti *fluorescent in situ hybridization* (FISH), PCR, dan *sequencing* untuk mendeteksi mutasi atau ekspresi gen yang tidak dapat terlihat dengan pewarnaan histologi maupun histokimia saja. Integrasi ini sangat relevan pada era kedokteran presisi, di mana terapi diarahkan pada biomarker spesifik. Buku *Current Status of Immunohistochemistry* (Cambridge, 2022) menekankan bahwa kualitas hasil IHK sangat dipengaruhi oleh pemilihan klon antibodi, teknik *epitope retrieval*, serta penerapan protokol yang baku.

Oleh sebab itu, dalam pembelajaran mengenai teknik dasar histokimia dan imunohistokimia, mahasiswa dan praktisi perlu memahami tidak hanya teori dan prosedur, tetapi juga tantangan serta perkembangan mutakhir, baik yang bersifat teknis, interpretatif, maupun integratif dengan metode molekuler. Bab ini akan membahas aplikasi utama histokimia dan IHK dalam patologi anatomi, termasuk kelebihan, keterbatasan, serta studi kasus yang menggambarkan pemanfaatannya dalam praktik klinis dan penelitian.

## B. Prinsip Dasar

Histokimia dan imunohistokimia (IHK) memiliki prinsip dasar yang berbeda namun saling melengkapi dalam analisis jaringan. **Histokimia** didasarkan pada reaksi kimia antara zat pewarna atau enzim dengan komponen spesifik jaringan. Melalui metode ini, berbagai substansi dapat dikenali, misalnya karbohidrat dengan *Periodic Acid-Schiff* (PAS), mukopolisakarida dengan *Alcian blue*, amiloid dengan *Congo red*, atau zat besi dengan *Perl's Prussian blue*. Setiap pewarnaan menghasilkan pola khas yang membantu dalam mengidentifikasi perubahan morfologis maupun biokimia pada jaringan.

**Imunohistokimia**, di sisi lain, bekerja berdasarkan interaksi antigen-antibodi. Antibodi digunakan untuk mengenali antigen tertentu dalam sel atau jaringan, yang kemudian divisualisasikan melalui sistem deteksi enzimatik atau fluoresensi. Teknik ini terbagi atas metode langsung (antibodi berlabel terikat langsung ke antigen) dan tidak langsung (antibodi primer dikenali oleh antibodi sekunder berlabel, menghasilkan sinyal yang lebih kuat). Perkembangan teknologi antibodi monoklonal, sistem deteksi kromogen (seperti DAB dan AEC), serta *epitope retrieval* menjadikan IHK semakin spesifik, sensitif, dan reproducible.

Kombinasi kedua prinsip ini memberikan keuntungan dalam praktik patologi anatomi: histokimia menawarkan metode sederhana untuk deteksi zat kimia jaringan, sementara IHK memungkinkan identifikasi protein spesifik yang berkaitan erat dengan diagnosis, prognosis, dan prediksi terapi.

### C. Aplikasi Histokimia dalam Patologi Anatomi

Histokimia merupakan salah satu metode klasik yang masih banyak digunakan dalam praktik patologi anatomi. Histokimia memiliki prinsip reaksi kimia antara zat pewarna atau enzim dengan komponen jaringan, teknik ini memungkinkan identifikasi berbagai substansi spesifik dalam jaringan, baik pada kondisi normal maupun patologis. Meskipun telah berkembang metode imunohistokimia dan molekuler yang lebih modern, histokimia tetap memiliki peran penting karena sifatnya yang sederhana, relatif murah, dan mampu memberikan informasi diagnostik yang bermakna.

#### 1. Diagnosis Penyakit Metabolik dan Degeneratif

- a. **Amiloidosis:** Pewarnaan *Congo red* merupakan metode baku untuk mendeteksi deposit amiloid. Bila diperiksa dengan mikroskop polarisasi, amiloid menunjukkan *apple-green birefringence*, yang bersifat khas.

- b. **Gangguan penyimpanan glikogen:** *Periodic Acid-Schiff (PAS)* digunakan untuk mengidentifikasi akumulasi glikogen pada jaringan, seperti pada glikogen storage disease maupun beberapa neoplasma.
- c. **Mukopolisakarida:** *Alcian blue* digunakan untuk mendeteksi mukopolisakarida asam pada jaringan, berguna misalnya pada karsinoma musinosum.
- d. **Zat besi:** *Perl's Prussian blue* efektif untuk mengidentifikasi hemosiderin, bermanfaat pada kasus hemosiderosis atau hemokromatosis.

## 2. Diagnosis Tumor

- a. **Retikulin stain:** Membantu mengevaluasi pola serat retikulin pada tumor hati. Hepatoseluler karsinoma biasanya memperlihatkan pola retikulin yang berkurang atau tidak teratur, sedangkan metastasis umumnya mempertahankan pola retikulin normal.
- b. **Mucicarmine:** Digunakan untuk mendeteksi mucin intraseluler, penting dalam membedakan adenokarsinoma dari karsinoma non-musinosus.
- c. **Oil red O / Sudan black:** Membantu identifikasi tumor dengan diferensiasi lipogenik, misalnya liposarkoma.

## 3. Diagnosis Infeksi

- a. **Bakteri:** Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif.
- b. **Basil tahan asam:** *Ziehl-Neelsen* atau *Auramine-Rhodamine* digunakan untuk mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan bakteri tahan asam lain.
- c. **Jamur:** Pewarnaan *Periodic Acid-Schiff (PAS)* dan *Grocott's Methenamine Silver (GMS)* sangat berguna untuk mengidentifikasi jamur (misalnya *Candida*, *Aspergillus*).
- d. **Spirochaeta:** Pewarnaan *Warthin-Starry* dapat membantu identifikasi organisme seperti *Treponema pallidum*.

## 4. Kelebihan dan Keterbatasan Histokimia

Histokimia unggul dalam hal biaya rendah, kemudahan, serta ketersediaan luas di laboratorium patologi anatomi. Namun, keterbatasan utamanya adalah kurangnya

spesifitas. Banyak zat pewarna dapat memberikan reaksi silang dengan komponen jaringan lain, sehingga interpretasi hasil harus hati-hati dan sering kali perlu konfirmasi dengan metode lain seperti imunohistokimia atau teknik molekuler.

#### **D. Aplikasi Imunohistokimia dalam Patologi Anatomi**

Imunohistokimia memiliki peran yang sangat luas dalam praktik patologi anatomi modern. Melalui interaksi antigen-antibodi, IHK memungkinkan identifikasi protein spesifik dalam jaringan sehingga membantu menentukan jenis, asal, dan sifat biologis suatu neoplasma. Panel marker imunohistokimia banyak digunakan untuk membedakan tumor epitel, mesenkimal, melanotik, hematolinfatik, maupun neuroendokrin, yang secara morfologi sering kali menyerupai satu sama lain. Sebagai contoh, sitokeratin (CK7/CK20) digunakan untuk karsinoma, vimentin dan desmin untuk tumor mesenkimal, S100 dan HMB-45 untuk melanoma, serta CD45 untuk limfoma.

Selain diagnosis, IHK juga penting dalam subklasifikasi tumor, misalnya TTF-1 dan Napsin A pada adenokarsinoma paru, p40/p63 pada karsinoma skuamosa paru, HepPar-1 dan arginase-1 pada hepatoseluler karsinoma, serta ER, PR, HER2, dan Ki-67 pada kanker payudara. Marker tersebut tidak hanya membantu diagnosis, tetapi juga menentukan prognosis dan memprediksi respons terhadap terapi target (Tabel). Indeks proliferasi Ki-67, misalnya, berkaitan dengan derajat agresivitas tumor, sedangkan ekspresi HER2, ER, dan PR menjadi dasar pemberian terapi hormonal maupun trastuzumab. Marker lain seperti p53, BCL-2, dan HIF-1 $\alpha$  juga berkontribusi dalam memahami mekanisme apoptosis, hipoksia, dan respons radioterapi.

Imunohistokimia juga dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi tertentu, misalnya antigen HPV pada lesi serviks, EBV pada karsinoma nasofaring dan limfoma, serta CMV pada pasien imunokompromais. Imunohistokimia tidak hanya menjadi alat diagnostik, tetapi juga sarana prognostik,

prediktif, sekaligus penelitian translasi menuju kedokteran presisi.

**Tabel 11.1** Contoh Aplikasi Imunohistokimia

<b>Kategori</b>	<b>Marker Utama</b>	<b>Contoh Aplikasi Klinis</b>
<b>Identifikasi jenis tumor</b>	CK7, CK20 (epitel); Vimentin, Desmin (mesenkimal); S100, HMB-45, Melan-A (melanoma); CD45, CD20, CD3 (limfoma)	Penentuan asal neoplasma primer atau metastasis
<b>Subklasifikasi tumor</b>	TTF-1, Napsin A (adenokarsinoma paru); p40/p63 (karsinoma skuamosa paru); HepPar-1, Arginase-1 (HCC); GFAP, IDH1 (glioma)	Diagnosis banding tumor organ spesifik
<b>Prognostik &amp; prediktif</b>	Ki-67 (proliferasi); p53, BCL-2 (apoptosis); ER, PR, HER2 (kanker payudara); HIF-1 $\alpha$ (hipoksia)	Menentukan prognosis, memilih terapi target
<b>Infeksi</b>	HPV, EBV, CMV antigen	Deteksi agen infeksi spesifik pada jaringan

Imunohistokimia memiliki keunggulan berupa spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi karena bekerja berdasarkan pengenalan antigen tertentu oleh antibodi. Melalui teknik ini, ahli patologi dapat mengidentifikasi asal suatu neoplasma, melakukan klasifikasi yang lebih tepat, serta mengevaluasi marker prognostik maupun prediktif yang berperan penting dalam terapi berbasis target. Oleh sebab itu, IHK menjadi salah satu metode utama dalam penerapan kedokteran presisi. Meski demikian, penggunaan IHK tidak terlepas dari keterbatasan, antara lain biaya pemeriksaan yang relatif mahal, ketergantungan pada mutu antibodi serta reagen,

dan perlunya penerapan protokol yang seragam. Selain itu, perbedaan teknik, sistem deteksi, maupun kualitas fiksasi jaringan dapat memengaruhi keandalan hasil, sehingga pengawasan dengan kontrol positif dan negatif mutlak diperlukan dalam setiap analisis.

#### E. Integrasi dengan Teknik Modern

Dalam dua dekade terakhir, imunohistokimia (IHK) tidak lagi digunakan secara terpisah, melainkan semakin erat dipadukan dengan berbagai teknologi modern dalam patologi molekuler. Peran utamanya adalah sebagai penghubung antara pemeriksaan morfologi konvensional dengan analisis molekuler yang lebih komprehensif.

Salah satu wujud integrasi tersebut adalah penerapan *fluorescent in situ hybridization* (FISH) untuk mendeteksi amplifikasi maupun translokasi gen, contohnya *HER2* pada kanker payudara, *ALK* dan *ROS1* pada kanker paru, serta *MYC* pada limfoma. Biasanya, pemeriksaan IHK dilakukan terlebih dahulu sebagai skrining, kemudian hasil yang meragukan dikonfirmasi dengan FISH.

Selain itu, teknik PCR maupun real-time PCR dipakai untuk mengidentifikasi mutasi genetik, misalnya *EGFR* pada adenokarsinoma paru atau *KRAS* pada karsinoma kolorektal, dengan hasil IHK tertentu (seperti TTF-1 atau Napsin A) yang dapat membantu menentukan panel gen mana yang perlu dianalisis.

Kemajuan terkini adalah pemanfaatan *next-generation sequencing* (NGS), yang memungkinkan analisis bersamaan terhadap ratusan hingga ribuan gen. Dalam praktiknya, IHK digunakan sebagai langkah awal untuk menyeleksi sampel yang akan diperiksa dengan NGS sekaligus memvalidasi ekspresi protein dari mutasi yang terdeteksi.

Integrasi antara IHK, histokimia, dan teknik molekuler ini menjadi fondasi utama kedokteran presisi, menjadikan patologi anatomi tidak hanya berfungsi sebagai ilmu diagnosis, tetapi

juga sebagai panduan dalam menentukan terapi individual berbasis biomarker.

**Tabel 11.2** Integrasi IHK dengan Teknik Molekuler

<b>Teknik</b>	<b>Tujuan</b>	<b>Contoh Aplikasi Klinis</b>
<b>FISH</b>	Deteksi amplifikasi atau translokasi gen	<i>HER2</i> (kanker payudara), <i>ALK/ROS1</i> (kanker paru), <i>MYC</i> (limfoma)
<b>PCR/ Real-time PCR</b>	Deteksi mutasi genetik	<i>EGFR</i> (kanker paru), <i>KRAS</i> (kanker kolorektal), <i>BRAF</i> (melanoma)
<b>NGS</b>	Analisis profil genetik luas untuk terapi personalisasi	Panel gen pada kanker paru, payudara, kolorektal, melanoma
<b>IHK + molekuler</b>	Validasi hasil mutasi dengan ekspresi protein	Konfirmasi ekspresi <i>HER2</i> , p53, <i>IDH1</i> , mismatch repair protein

## F. Studi Kasus dan Aplikasi

### 1. Tumor Payudara

Kanker payudara merupakan salah satu contoh klasik di mana imunohistokimia (IHK) berperan penting dalam menentukan subtype molekuler dan pemilihan terapi. Pemeriksaan ER (Estrogen Receptor), PR (Progesterone Receptor), *HER2*, dan Ki-67 digunakan untuk membagi kanker payudara ke dalam kategori Luminal A, Luminal B, *HER2*-enriched, dan Triple Negative. Penentuan status ER/PR memandu pemberian terapi hormonal, sedangkan *HER2* berhubungan dengan penggunaan trastuzumab. Indeks proliferasi Ki-67 menjadi parameter tambahan untuk stratifikasi risiko dan prognosis.

### 2. Limfoma Non-Hodgkin (LNH)

Diagnosis LNH sangat bergantung pada panel IHK. CD20 digunakan untuk mengidentifikasi sel B, sedangkan CD3 untuk sel T. Ekspresi marker tambahan seperti *BCL2*, *BCL6*, dan Ki-67 membantu menentukan subtype limfoma

serta menilai prognosis. Penanda ini penting karena respon terapi dan perjalanan penyakit berbeda antar subtipe.

### 3. Tumor Paru

Pemeriksaan IHK digunakan untuk membedakan adenokarsinoma paru dari karsinoma skuamosa, yang penting karena pilihan terapi berbeda. TTF-1 dan Napsin A biasanya positif pada adenokarsinoma paru, sementara p40 atau p63 digunakan untuk mengidentifikasi karsinoma skuamosa. Dalam konteks terapi target, IHK juga dipakai untuk menilai ekspresi PD-L1, yang berhubungan dengan respons terhadap imunoterapi.

### 4. Tumor Otak (Glioma)

Pada glioma, marker IHK seperti GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) digunakan untuk mengonfirmasi asal glial. Pemeriksaan IDH1 (R132H *mutation-specific antibody*) membantu membedakan glioma dengan prognosis lebih baik, sedangkan ekspresi p53 berkorelasi dengan perubahan molekuler tertentu. Integrasi IHK dengan pemeriksaan molekuler semakin penting dalam klasifikasi WHO terbaru untuk tumor otak.

## G. Kesimpulan

Histokimia dan imunohistokimia (IHK) merupakan metode utama yang hingga kini tetap esensial dalam praktik patologi anatomi. Histokimia, melalui prinsip reaksi kimia yang relatif sederhana, berperan penting dalam mengidentifikasi berbagai komponen jaringan, seperti mukopolisakarida, amiloid, maupun pigmen tertentu. Sebaliknya, IHK menawarkan tingkat spesifisitas dan sensitivitas yang lebih tinggi dengan memanfaatkan interaksi antigen-antibodi, sehingga sangat berguna untuk menentukan asal tumor, melakukan subklasifikasi, serta mengevaluasi marker yang berhubungan dengan prognosis maupun prediksi respons terapi.

Kemajuan teknologi menjadikan IHK semakin terintegrasi dengan pendekatan molekuler modern, termasuk *fluorescent in situ hybridization* (FISH), PCR, dan *next-generation sequencing* (NGS). Integrasi ini mengarahkan patologi anatomi tidak lagi terbatas pada diagnosis morfologis, tetapi juga menjadi landasan dalam pemilihan terapi individual yang ditentukan oleh biomarker spesifik. Oleh karena itu, histokimia dan imunohistokimia akan tetap menjadi pilar penting bagi kegiatan diagnostik, penelitian, serta pengembangan terapi baik pada penyakit neoplastik maupun non-neoplastik di masa mendatang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *J Clin Oncol.* 2020;38(12):1346–66. doi:10.1200/JCO.19.02309.
- Cambridge University Press. Current Status of Immunohistochemistry. In: *Immunohistochemistry*. Cambridge: Cambridge University Press; 2022. p. 1–15.
- Dey P. Basic principles and applications of histochemistry. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018;22(1):111–6. doi:10.4103/jomfp.JOMFP\_20\_18.
- Golberg M, Wysiadecki G, Polguy M, Topol M, Żytkowski A, Haładaj R. Application of histochemical stains in anatomical research. *Transl Res Anat.* 2024;29:100248. doi:10.1016/j.tria.2024.100248.
- Howat WJ, Lewis A, Jones P, Smith K, Quirke P, Warford A, et al. Antibody validation of immunohistochemistry for biomarker discovery: recommendations of a consortium of academic and pharmaceutical-based histopathology researchers. *J Pathol.* 2014;232(4):441–50. doi:10.1002/path.4282.
- Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(6):411–8. doi:10.4132/jptm.2016.08.08.
- Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231–51. doi:10.1093/neuonc/noab106.
- Pelosi G, Fabbri A, Bianchi F, Maisonneuve P, Rossi G, Barbareschi M, et al. Immunohistochemistry in lung cancer: diagnostic utility of TTF-1, Napsin A, p40, and p63. *Histopathology.* 2012;61(6):1076–89. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04194.x.

- Vranic S, Ghosh N, Kimbung S, Harbeck N. PD-L1 testing by immunohistochemistry in immuno-oncology. *Cancer Cell Int.* 2023;23(1):25. doi:10.1186/s12935-022-02892-1.
- Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: ASCO/CAP clinical practice guideline focused update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(11):1364–82. doi:10.5858/arpa.2018-0902-SA.
- Yigzaw D, Dagnaw GG, Woredekal AT, Tsegaye TS. Review of immunohistochemistry techniques: applications, current status, and future perspectives. *Semin Diagn Pathol.* 2024;41(9):1–10. doi:10.1053/j.semdp.2024.05.001.

# BAB 12

## APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMMUNOHISTOKIMIA BIDANG FORENSIK

dr. Denys Putra Alim, Sp.FM.

### A. Pendahuluan

Pemeriksaan histopatologi merupakan salah satu cabang utama dalam ilmu patologi yang memiliki peran penting dalam praktik kedokteran forensik. Pemeriksaan rutin dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (H&E) telah lama digunakan sebagai metode standar untuk menilai struktur morfologi sel dan jaringan. Melalui teknik ini, ahli dapat mengidentifikasi perubahan arsitektur jaringan, adanya reaksi inflamasi, perdarahan, nekrosis, atau proses patologis lain yang relevan dengan evaluasi forensik. Namun, pemeriksaan H&E memiliki keterbatasan, terutama ketika dihadapkan pada pertanyaan-pertanyaan yang lebih kompleks terkait aspek waktu, mekanisme, dan penyebab kematian (Bancroft & Gamble, 2019).

Dalam konteks kedokteran forensik, analisis jaringan tidak hanya ditujukan untuk mendeskripsikan lesi, melainkan juga untuk menjawab persoalan yuridis dan investigatif. Sebagai contoh, penentuan usia luka (*wound age*) sangat penting dalam rekonstruksi peristiwa kriminal, sementara identifikasi jaringan atau cairan tubuh dapat menjadi bukti biologis yang menentukan dalam kasus kekerasan seksual maupun pembunuhan. Demikian pula, penilaian mengenai mekanisme penyebab kematian, seperti asfiksia, trauma tumpul, keracunan, atau gangguan jantung mendadak, sering kali tidak dapat dijelaskan secara memadai dengan H&E saja (Cordeiro et al., 2015).

Seiring dengan berkembangnya teknologi, teknik histokimia dan imunohistokimia (IHK) menjadi metode penunjang yang krusial. Histokimia memungkinkan deteksi komponen kimiawi spesifik dalam jaringan melalui reaksi pewarnaan tertentu, sedangkan IHK menggunakan antibodi untuk mengidentifikasi antigen dengan presisi tinggi. Kombinasi kedua pendekatan ini memperkaya interpretasi histopatologi, karena tidak hanya memperlihatkan aspek morfologi, tetapi juga dimensi molekuler dan biokimia yang lebih mendalam (Roulson, Benbow, & Hasleton, 2005).

Penggunaan histokimia dan IHK dalam kedokteran forensik telah terbukti memberikan nilai tambah signifikan. Keduanya tidak hanya membantu memperkirakan usia luka, melainkan juga mendukung identifikasi cairan tubuh, analisis toksikologi, serta memperjelas mekanisme kematian. Dengan demikian, integrasi teknik histopatologi rutin dengan metode penunjang ini menjadi landasan penting dalam menghasilkan kesimpulan ilmiah yang lebih objektif, spesifik, dan dapat dipertanggungjawabkan dalam proses peradilan (Madea, 2015).

## **B. Prinsip Dasar Pemeriksaan**

Histokimia merupakan teknik pewarnaan yang didasarkan pada interaksi spesifik antara zat kimia dalam jaringan dengan reagen histologis tertentu. Metode ini memungkinkan identifikasi molekul atau struktur kimia tertentu yang tidak dapat ditunjukkan secara jelas melalui pewarnaan rutin Hematoxylin-Eosin (H&E). Contoh aplikasinya termasuk *Periodic Acid-Schiff* (PAS) untuk mendeteksi karbohidrat dan mukopolisakarida, *Perls' Prussian Blue* untuk mendeteksi besi (hemosiderin), *Oil Red O* untuk lipid netral pada kasus emboli lemak, serta *Masson's Trichrome* untuk kolagen yang bermanfaat dalam menilai fibrosis atau cedera jaringan ikat (Bancroft & Gamble, 2019). Dalam kedokteran forensik, pemeriksaan ini dapat membantu memperkirakan usia perdarahan, mendeteksi sisa metabolit tertentu, dan

mempertegas adanya perubahan jaringan akibat trauma atau penyakit.

Sebaliknya, imunohistokimia (IHK) menawarkan presisi yang lebih tinggi karena menggunakan antibodi spesifik untuk mengenali antigen tertentu dalam jaringan. Deteksi antigen dapat dilakukan melalui konjugasi enzim (misalnya peroksidase) atau fluorokrom, yang menghasilkan sinyal visual pada lokasi antigen tersebut. Aplikasi IHK dalam bidang forensik sangat luas, antara lain penggunaan CD31 untuk menandai sel endotel dan menilai keberadaan mikroemboli, *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) untuk mengidentifikasi kerusakan jaringan glia di otak, *Surfactant Protein-A* (SP-A) untuk mendeteksi aspirasi air dalam kasus tenggelam, serta *Prostate-Specific Antigen* (PSA) sebagai penanda cairan semen dalam kasus kekerasan seksual (Gomes et al., 2015). Dengan demikian, IHK berperan sebagai metode konfirmasi yang lebih spesifik dalam mendukung diagnosis forensik yang berbasis histopatologi.

Secara konseptual, histokimia dan imunohistokimia memiliki kesamaan karena keduanya menyoroti komponen spesifik dalam jaringan. Namun, terdapat perbedaan mendasar pada prinsip dasar dan tingkat spesifitasnya. Histokimia terutama mengandalkan reaksi kimia antara zat pewarna dengan substrat biologis, sehingga bersifat lebih umum dan deskriptif. Sebaliknya, imunohistokimia memanfaatkan interaksi antigen-antibodi, yang memungkinkan deteksi lebih akurat bahkan pada tingkat molekuler, sehingga hasilnya lebih presisi untuk keperluan forensik maupun penelitian biomedis (Cattaneo & Domeneghini, 2010). Dengan mengombinasikan kedua teknik ini, ahli forensik dapat memperoleh gambaran menyeluruh, baik dari sisi morfologi, komposisi kimia, maupun ekspresi protein spesifik, yang pada akhirnya meningkatkan validitas dan reliabilitas kesimpulan ilmiah.

## C. Aplikasi dalam Bidang Forensik

### 1. Estimasi Usia Luka

Penentuan usia luka merupakan salah satu aspek paling krusial dalam kedokteran forensik, karena berhubungan langsung dengan rekonstruksi kronologi kejadian dalam kasus tindak kekerasan. Histopatologi rutin dengan H&E hanya dapat menunjukkan gambaran umum, misalnya adanya perdarahan, infiltrasi sel radang, atau fibrosis. Namun, untuk menentukan usia luka secara lebih presisi, diperlukan teknik tambahan.

Histokimia berperan penting dalam hal ini. Pewarnaan Perls' Prussian Blue dapat mendeteksi hemosiderin, yang terbentuk dari degradasi hemoglobin, sehingga menjadi indikator adanya perdarahan lama. Sementara itu, *Masson's Trichrome* sangat bermanfaat untuk menilai maturasi kolagen pada proses penyembuhan luka, yang berjalan bertahap seiring waktu. Dengan demikian, histokimia memberikan gambaran temporal mengenai perubahan kimiawi jaringan yang mendukung estimasi usia luka.

Imunohistokimia (IHK) memberikan detail molekuler yang lebih presisi. Penanda inflamasi seperti CD15 dan CD45 menandai infiltrasi leukosit pada fase awal, sementara CD31, CD34, dan VEGF menggambarkan neovaskularisasi pada fase proliferasi. Pada tahap lanjut, ekspresi  $\alpha$ -SMA (*alpha-smooth muscle actin*) menandakan aktivasi fibroblas dan pembentukan jaringan parut (Tsokos et al., 2010). Dengan pola ekspresi yang kronologis, IHK dapat membantu membangun linimasa luka secara lebih akurat dibandingkan histologi konvensional.

Kombinasi antara histokimia dan imunohistokimia memungkinkan pendekatan komprehensif dalam menentukan usia luka. Hal ini sangat penting dalam kasus forensik, misalnya untuk membedakan luka hidup dengan luka postmortem, atau untuk menentukan apakah luka terjadi sebelum atau sesudah suatu peristiwa tertentu. Akurasi ini berimplikasi langsung pada interpretasi yuridis,

terutama terkait pembuktian tindak pidana penganiayaan atau pembunuhan.

## 2. Identifikasi Penyebab Kematian

Dalam kasus kematian yang tidak jelas, penentuan penyebab kematian menjadi inti dari pemeriksaan forensik. Pemeriksaan rutin tidak selalu memadai, khususnya pada kasus di mana tanda-tanda morfologi tidak spesifik. Di sinilah histokimia dan IHK dapat memberikan kontribusi signifikan.

Histokimia berguna, misalnya, dalam mendeteksi emboli lemak pasca trauma tulang panjang melalui pewarnaan *Oil Red O* atau *Sudan III*. Pewarnaan ini menyoroti lipid netral yang terbawa ke dalam sirkulasi darah dan menyumbat kapiler paru atau otak. Selain itu, *Von Kossa stain* dapat digunakan untuk mengidentifikasi deposit kalsium, yang relevan pada kasus kematian dengan kelainan metabolik atau kerusakan jaringan yang melibatkan kalsifikasi.

Imunohistokimia memberikan tambahan bukti lebih spesifik. Penanda  *$\beta$ -amyloid precursor protein* ( $\beta$ -APP) digunakan untuk mendeteksi cedera aksonal difus pada trauma otak dini, bahkan sebelum perubahan morfologi tampak jelas (Shkrum & Ramsay, 2007). *Surfactant Protein-A* (SP-A) dapat digunakan untuk mendeteksi aspirasi cairan pada paru-paru korban tenggelam atau kasus asfiksia. Sementara itu, *Aquaporin-1* dan *Aquaporin-4* dapat mendukung diagnosis kematian akibat tenggelam melalui identifikasi pergeseran cairan pada jaringan.

Dengan menggabungkan kedua pendekatan ini, ahli forensik dapat memperoleh bukti objektif yang memperkuat interpretasi klinis maupun autopsi. Bukti tersebut sangat berharga dalam kasus-kasus di mana penyebab kematian tidak jelas secara makroskopis, atau ketika ada kebutuhan untuk konfirmasi ilmiah di pengadilan.

### 3. Identifikasi Jaringan atau Organ

Pada kasus forensik, sering kali tubuh ditemukan dalam kondisi fragmentasi, mutilasi, atau pembakaran. Dalam keadaan demikian, identifikasi jaringan atau organ menjadi tantangan besar karena kehilangan struktur anatomis yang utuh.

Histokimia dapat membantu membedakan jenis jaringan melalui pola pewarnaan tertentu. Sebagai contoh, pola serabut retikulin dapat menunjukkan adanya jaringan ikat tertentu, sementara pewarnaan kolagen dengan *Masson's Trichrome* membantu mengenali jaringan fibrosa. Meskipun demikian, kemampuan histokimia masih terbatas pada level jaringan dan belum mencapai spesifisitas seluler atau molekuler.

Imunohistokimia menjadi metode yang sangat berguna dalam situasi ini. Ekspresi *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) mengonfirmasi adanya jaringan glia, sehingga membantu identifikasi otak atau sumsum tulang belakang. Desmin menandai otot, baik otot rangka maupun otot polos, sedangkan *Cytokeratin 7* (CK7) dan *Cytokeratin 20* (CK20) membantu menentukan asal jaringan epitel, misalnya dari saluran pencernaan atau sistem genitourinaria (Cattaneo et al., 2010).

Penerapan kombinasi histokimia dan IHK tidak hanya meningkatkan akurasi identifikasi, tetapi juga sangat relevan dalam kasus korban kebakaran, ledakan, atau kecelakaan massal. Identifikasi jaringan secara tepat dapat memfasilitasi proses identifikasi individu maupun analisis penyebab kematian.

### 4. Identifikasi Cairan Tubuh

Identifikasi cairan tubuh merupakan aspek yang sangat krusial dalam penyelidikan kasus kriminal, khususnya pada perkara yang berkaitan dengan kekerasan seksual, pembunuhan, maupun tindak pidana lain yang melibatkan bukti biologis. Keberadaan cairan biologis pada TKP atau tubuh korban sering menjadi titik awal untuk

menghubungkan pelaku dengan korban, sehingga metode deteksi yang sensitif dan spesifik sangat diperlukan. Selama ini, analisis DNA menjadi standar emas dalam mengidentifikasi asal-usul cairan tubuh. Namun demikian, keterbatasan kerap muncul, terutama ketika sampel mengalami degradasi akibat faktor lingkungan seperti panas, kelembaban, mikroorganisme, maupun usia sampel yang terlalu lama (Virgili et al., 2018). Oleh karena itu, teknik penunjang seperti histokimia dan imunohistokimia memberikan nilai tambah dalam mengatasi keterbatasan tersebut.

Imunohistokimia (IHK) menjadi salah satu metode paling menonjol karena menawarkan sensitivitas dan spesifisitas tinggi. Beberapa penanda biologis telah digunakan secara luas dalam forensik untuk mendeteksi cairan tubuh tertentu. Misalnya, *Prostate-Specific Antigen* (PSA) dan *Prostatic Acid Phosphatase* (PAP) merupakan penanda klasik yang digunakan untuk mengidentifikasi semen, dengan sensitivitas tinggi meskipun jumlah sperma dalam sampel sangat rendah atau bahkan tidak ditemukan akibat azoospermia (Luo et al., 2018). *Glycophorin A* telah digunakan secara luas sebagai marker eritrosit dalam bercak darah, sehingga membantu dalam membedakan apakah suatu bercak benar berasal dari darah manusia atau bukan (Virgili et al., 2018). Selain itu,  $\alpha$ -amylase menjadi penanda spesifik untuk air liur karena enzim ini diproduksi dalam jumlah besar oleh kelenjar saliva. Sementara itu, *Human Vaginal Epithelial Antigen* (HVEAg) dapat digunakan untuk mendeteksi cairan vagina, yang sangat relevan dalam konteks kasus kekerasan seksual.

Di sisi lain, histokimia memainkan peranan yang lebih terbatas tetapi tetap berguna dalam konteks tertentu. Pewarnaan histokimia dapat mendeteksi komponen kimiawi seperti karbohidrat, lipid, atau protein dalam cairan biologis. Sebagai contoh, *Periodic Acid-Schiff* (PAS) dapat membantu mendeteksi kandungan glikoprotein dalam cairan tertentu.

Walaupun demikian, kelemahan utama histokimia terletak pada rendahnya sensitivitas serta keterbatasan dalam memberikan informasi yang benar-benar spesifik terkait asal-usul cairan (Bancroft & Gamble, 2019). Oleh sebab itu, histokimia lebih sering dipakai sebagai metode pelengkap, bukan metode utama.

Keunggulan utama dari IHK dalam identifikasi cairan tubuh adalah kemampuannya untuk tetap mendeteksi antigen spesifik meskipun DNA dalam sampel sudah mengalami degradasi berat. Hal ini memberikan keuntungan yang signifikan pada kasus forensik, terutama ketika bukti biologis telah lama terpapar lingkungan luar atau melalui proses pembusukan. Selain itu, hasil positif dari pemeriksaan IHK dapat memperkuat interpretasi hasil DNA, atau bahkan menggantikannya bila DNA gagal dianalisis. Dengan demikian, IHK berkontribusi besar terhadap penguatan nilai pembuktian ilmiah di pengadilan, karena dapat menunjukkan keterkaitan yang jelas antara bukti biologis dengan peristiwa kriminal yang diselidiki (Virgili et al., 2018; Shkrum & Ramsay, 2007).

## 5. Forensik Toksikologi Molekuler

Forensik toksikologi tidak hanya terbatas pada analisis kimia, tetapi juga dapat diperkuat melalui pemeriksaan histologis dan molekuler. Histokimia dapat mendeteksi adanya pigmen logam seperti besi (Fe) atau tembaga (Cu) pada jaringan, serta bilirubin yang mengindikasikan kerusakan hati akibat toksin.

Imunohistokimia menambahkan dimensi baru melalui deteksi mekanisme kerusakan seluler. Penanda apoptosis seperti Caspase-3 dan BCL-2 menunjukkan pola kematian sel akibat paparan obat atau racun tertentu (Madea, 2015). Selain itu, ekspresi *Heat Shock Proteins* (HSPs) atau *cytochrome P450 enzymes* dapat digunakan untuk mempelajari respons jaringan terhadap paparan zat toksik.

Dengan pendekatan ini, toksikologi molekuler forensik dapat menjelaskan tidak hanya keberadaan zat toksik, tetapi juga efek biologisnya pada jaringan. Hal ini memperkuat interpretasi toksikologi konvensional, sekaligus memberikan bukti tambahan yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah maupun hukum.

#### **D. Kelebihan dan Keterbatasan Pemeriksaan**

Imunohistokimia (IHK) memiliki sejumlah kelebihan yang membuatnya sangat bernilai dalam konteks kedokteran forensik. Pertama, metode ini memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi karena didasarkan pada interaksi antigen-antibodi yang presisi. Hal ini memungkinkan identifikasi komponen biologis spesifik, seperti protein tertentu pada jaringan atau cairan tubuh, bahkan dalam jumlah kecil sekalipun. Kedua, IHK dapat diaplikasikan pada jaringan yang telah difiksasi formalin dan diblok parafin, sehingga sediaan yang sudah diawetkan tetap dapat diperiksa, termasuk sampel lama yang sering ditemui dalam kasus forensik (Bussolati & Leonardo, 2008). Ketiga, hasil IHK memberikan bukti objektif yang dapat memperkuat temuan histopatologi rutin dengan pewarnaan H&E atau histokimia, sehingga meningkatkan keakuratan interpretasi, misalnya dalam penentuan usia luka, mekanisme kematian, atau identifikasi jaringan (Madea, 2015). Dengan demikian, kelebihan-kelebihan ini menjadikan IHK sebagai salah satu teknik penunjang yang sangat penting dalam menunjang analisis morfologi jaringan forensik.

Meski demikian, teknik IHK tidak lepas dari sejumlah keterbatasan yang perlu diperhatikan dalam penerapannya. Dari sisi praktis, pemeriksaan ini memiliki biaya yang relatif tinggi karena memerlukan antibodi spesifik, reagen mahal, serta infrastruktur laboratorium yang memadai. Selain itu, IHK membutuhkan laboratorium dengan fasilitas khusus, termasuk sistem ventilasi, mikroskop fluoresen atau mikroskop cahaya berkualitas tinggi, serta teknisi berpengalaman (Bancroft & Gamble, 2019). Interpretasi hasil IHK pun memerlukan keahlian

khusus dari seorang histopatologis atau ahli forensik, karena pola ekspresi dapat bervariasi bergantung pada jenis jaringan, metode fiksasi, serta kondisi sampel (Roulson et al., 2005). Keterbatasan lain yang signifikan adalah adanya potensi kesalahan akibat kualitas fiksasi yang buruk; misalnya, fiksasi yang terlalu lama atau tidak merata dapat merusak epitop antigen sehingga menyebabkan hasil negatif palsu atau pewarnaan non-spesifik. Dengan demikian, walaupun IHK menawarkan banyak keunggulan, keterbatasan ini menunjukkan bahwa metode tersebut harus digunakan secara hati-hati, dikombinasikan dengan teknik lain, serta diinterpretasikan oleh tenaga ahli berpengalaman agar hasilnya valid dan dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah maupun hukum.

#### **E. Tren Terkini dan Prospek**

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi telah memperluas secara signifikan peran histokimia dan imunohistokimia dalam kedokteran forensik. Salah satu inovasi penting adalah multiplex immunofluorescence, yang memungkinkan deteksi simultan berbagai marker dalam satu preparat jaringan. Hal ini memberikan keuntungan besar, karena dinamika biologis suatu proses seperti inflamasi atau penyembuhan luka dapat dipetakan secara lebih menyeluruh melalui visualisasi beberapa antigen secara bersamaan (Stack et al., 2014). Di samping itu, kemajuan dalam digital pathology dan image analysis telah meningkatkan objektivitas interpretasi hasil, dengan kemampuan melakukan kuantifikasi ekspresi marker secara otomatis dan mengurangi subjektivitas penilaian manual (Madabhushi & Lee, 2016). Perkembangan juga terjadi pada penemuan panel biomarker baru yang menjanjikan estimasi usia luka lebih akurat, dengan kombinasi marker inflamasi, angiogenesis, dan remodeling jaringan yang memberikan gambaran kronologi lebih presisi dibandingkan pendekatan tunggal (Madea, 2015). Lebih jauh, integrasi IHK dengan metode molekuler seperti *polymerase chain reaction* (PCR)

dan *in situ hybridization* telah membuka peluang analisis multidisipliner, yang tidak hanya menilai ekspresi protein tetapi juga tingkat transkripsi gen. Sinergi ini memungkinkan investigasi forensik memperoleh informasi mendalam mengenai patogenesis cedera, toksikologi molekuler, hingga identifikasi individu dalam kondisi sampel yang sangat terbatas atau terdegradasi (Bussolati & Leonardo, 2008). Dengan demikian, perkembangan teknologi mutakhir menjadikan histokimia dan imunohistokimia bukan hanya alat diagnostik tambahan, melainkan komponen integral dalam pendekatan forensik modern yang berbasis bukti ilmiah dan multidisipliner.

## **F. Kesimpulan**

Pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia memiliki peranan yang sangat penting dalam kedokteran forensik. Kedua metode ini mampu menjawab pertanyaan yang tidak dapat dipenuhi hanya dengan pemeriksaan histopatologi rutin. Kombinasi histokimia dan imunohistokimia terbukti bermanfaat dalam estimasi usia luka, identifikasi jaringan dan cairan tubuh, serta diagnosis penyebab kematian. Meskipun terdapat keterbatasan teknis dan biaya, perkembangan teknologi menjanjikan aplikasi yang lebih luas di masa depan, sehingga dapat memperkuat akurasi pemeriksaan forensik dan mendukung proses penegakan hukum secara ilmiah.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2019). *Theory and practice of histological techniques* (8th ed.). Churchill Livingstone Elsevier.
- Bussolati, G., & Leonardo, E. (2008). Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *Journal of Clinical Pathology*, *61*(11), 1184–1192.
- Cattaneo, C., & Domeneghini, C. (2010). Histochemistry and immunohistochemistry in forensic pathology. In J. Siegel & P. Saukko (Eds.), *Encyclopedia of forensic sciences* (2nd ed., pp. 306–313). Academic Press.
- Cordeiro, C., Silva, R., & Costa, S. (2015). The importance of immunohistochemistry in forensic medicine: Review and perspectives. *Forensic Science International*, *254*, 194–200.
- Gomes, I., Inês, L. S., & Vieira, D. N. (2015). The contribution of immunohistochemistry in forensic practice. *Forensic Science Research*, *1*(1), 3–13.
- Luo, H., Hu, L., Wang, X., Li, Q., & Guo, Y. (2018). Detection of semen markers in sexual assault cases: A review. *Forensic Science International: Genetics*, *36*, 25–33.
- Madabhushi, A., & Lee, G. (2016). Image analysis and machine learning in digital pathology: Challenges and opportunities. *Medical Image Analysis*, *33*, 170–175.
- Madea, B. (2015). Methods for determining time of death. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, *11*(3), 367–377.
- Roulson, J., Benbow, E. W., & Hasleton, P. S. (2005). Discrepancies between clinical and autopsy diagnosis and the value of post mortem histology: A meta-analysis and review. *Histopathology*, *47*(6), 551–559.
- Shkrum, M. J., & Ramsay, D. A. (2007). *Forensic pathology of trauma: Common problems for the pathologist*. Humana Press.

- Stack, E. C., Wang, C., Roman, K. A., & Hoyt, C. C. (2014). Multiplexed immunohistochemistry, imaging, and quantitation: A review, with an assessment of Tyramide signal amplification, multispectral imaging and multiplex analysis. *Methods*, 70(1), 46–58.
- Tsokos, M., Sperhake, J. P., & Paulsen, F. (2010). Histological and immunohistochemical study of vital reaction in human skin wounds. *International Journal of Legal Medicine*, 124(6), 493–501.
- Virgili, A., Bianchi, T., Dell'Acqua, L., & Bini, V. (2018). Immunohistochemistry as a tool for the identification of body fluids in forensic medicine. *Forensic Science International*, 287, 103–109.

# BAB 13

## APLIKASI HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA BIDANG INDUSTRI FARMASI

apt. Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D.

### A. Pendahuluan

Sejarah Singkat Pewarnaan Jaringan. Sejarah. Pewarnaan jaringan memiliki akar sejarah yang bermula pada abad ke-17, ketika Antonie van Leeuwenhoek menggunakan mikroskop primitif untuk mengamati struktur biologis tanpa teknik pewarnaan(Cocquyt, 2022). Pada masa ini, pengamatan terbatas pada morfologi dasar karena kurangnya kontras. Perkembangan signifikan terjadi pada abad ke-19 seiring revolusi industri kimia, dimana pewarnaan sintetis seperti anilin diperkenalkan(Bracegirdle, 1993). Joseph von Gerlach pada tahun 1858 merupakan pelopor yang menerapkan karmin untuk mewarnai jaringan saraf, diikuti oleh Karl Weigert yang mengembangkan pewarnaan mielin(McEwan, 1991). Era ini juga mencatat kontribusi Rudolf Virchow dalam patologi seluler, yang mendorong standarisasi pewarnaan(Schultz, 2008).

Pada akhir abad ke-19, teknik pewarnaan rutin seperti hematoksilin-eosin (H&E) dikembangkan oleh ilmuwan seperti Bohmer dan Ehrlich, memungkinkan diferensiasi inti dan sitoplasma. Paul Ehrlich secara khusus berjasa dalam menerapkan prinsip kimiawi untuk pewarnaan diferensial, yang menjadi dasar diagnostik histopatologi(Bosch and Rosich, 2008). Abad ke-20 membawa inovasi lebih lanjut dengan imunohistokimia (IHK), yang dipelopori oleh Albert Coons pada tahun 1940-an yang menggunakan antibodi fluoresen untuk deteksi antigen(Coons, 1956). Kemajuan dalam biologi

molekuler dan teknologi antibodi monoklonal pada 1970-an memperluas aplikasi IHK untuk diagnosis tumor dan penelitian penyakit.

Perkembangan mutakhir mencakup digitalisasi dan automasi, dimana pewarnaan jaringan terintegrasi dengan kecerdasan buatan untuk analisis kuantitatif. Sejarah pewarnaan jaringan mencerminkan evolusi dari metode empiris menuju pendekatan spesifik berbasis imunologi, yang terus merevolusi diagnostik medis dan ilmu biomedis(Darmayanti, 2024).

## **B. Peran Histokimia dan IHK dalam Diagnosis Modern**

Peran Histokimia dan Imunohistokimia dalam Diagnosis Modern. Histokimia dan Imunohistokimia (IHK) merupakan pilar fundamental dalam patologi diagnostik modern, yang memungkinkan identifikasi tepat komponen seluler dan molekuler dalam jaringan. Teknik-teknik ini telah mentransformasi pendekatan diagnostik dari analisis morfologi konvensional menuju evaluasi berbasis biomarker, sehingga meningkatkan akurasi, reproduibilitas, dan relevansi klinis(Ying et al., 2024).

Histokimia berperan dalam visualisasi komponen kimiawi jaringan melalui reaksi spesifik berdasarkan sifat biokimia. Pewarnaan rutin seperti Hematoksin dan Eosin (H&E) menjadi dasar untuk menilai arsitektur jaringan dan perubahan patologis umum, sementara pewarnaan khusus—seperti Periodic Acid-Schiff (PAS) untuk karbohidrat atau Masson Trichrome untuk jaringan ikat—memungkinkan identifikasi kondisi seperti steatosis hepatic, amyloidosis, atau fibrosis. Aplikasi ini terutama vital dalam skrining awal dan diagnosis banding, memberikan landasan histologis yang esensial sebelum analisis lebih lanjut.

Imunohistokimia (IHK) melengkapi histokimia dengan spesifisitas tinggi melalui deteksi antigen menggunakan antibodi. Dalam onkologi, IHK berperan kritis untuk klasifikasi tumor (misalnya, penanda sitokeratin untuk karsinoma), penentuan prognosis (seperti status reseptor estrogen pada

kanker payudara), dan prediksi respons terapi (contohnya, ekspresi HER2). Selain itu, IHK digunakan dalam diagnosis penyakit infeksi (deteksi antigen virus atau bakteri) dan gangguan neurologis (identifikasi protein tau pada Alzheimer). Kemajuan dalam automasi dan digitalisasi telah menstandarisasi IHK, mendukung patologi personalisasi melalui analisis kuantitatif.

Integrasi kedua teknik ini dalam diagnosis modern memungkinkan pendekatan hierarkis: histokimia memberikan konteks morfologis, sedangkan IHK menambahkan lapisan molekuler yang spesifik. Sinergi ini meningkatkan ketepatan subclassification penyakit, seperti dalam limfoma atau tumor ganas, yang langsung memengaruhi strategi terapi. Dengan terus berkembangnya biomarker, peran histokimia dan IHK semakin sentral dalam era kedokteran presisi, menekankan pentingnya validasi dan kontrol kualitas yang ketat.

### **C. Prinsip Dasar Preparasi Jaringan**

Preparasi jaringan merupakan fondasi esensial dalam histologi dan patologi, yang bertujuan mempertahankan integritas struktural dan komponen kimiawi jaringan untuk analisis mikroskopis. Proses ini melibatkan serangkaian tahap sistematis yang harus dilakukan secara sequential untuk menghindari degradasi dan artefak.

Tahap pertama adalah fiksasi, dimana jaringan diawetkan menggunakan zat kimia seperti formalin netral yang membentuk ikatan silang dengan protein, sehingga mencegah autolisis dan mempertahankan morfologi. Fiksasi yang optimal bergantung pada faktor seperti konsentrasi, waktu, dan suhu. Selanjutnya, dehidrasi dilakukan dengan melakukan jaringan melalui seri alkohol bertingkat (misalnya, etanol 70% hingga 100%) untuk menghilangkan air secara gradual, meminimalkan penyusutan.

Setelah dehidrasi, clearing menggunakan pelarut organik seperti xilena atau toluena membuat jaringan transparan dengan menggantikan alkohol, sehingga memfasilitasi infiltrasi media

embedding. Tahap embedding kemudian mengimpregnasi jaringan dengan parafin atau resin, yang mengeras untuk membentuk blok yang stabil. Blok ini kemudian dipotong menggunakan sectioning dengan mikrotom menjadi irisan tipis (umumnya 3–5  $\mu\text{m}$ ) yang ditempel pada kaca objek.

Akhirnya, pewarnaan diterapkan untuk meningkatkan kontras; misalnya, hematoksilin dan eosin (H&E) membedakan inti dan sitoplasma. seluruh proses memerlukan kontrol ketat terhadap kondisi seperti pH dan suhu untuk memastikan reproduksibilitas dan akurasi diagnostik.

#### **D. Histokimia: Visualisasi Komponen Kimiawi Jaringan**

Histokimia merupakan teknik mikroskopis yang memanfaatkan reaksi kimia spesifik untuk mengidentifikasi dan memvisualisasikan komponen biokimia dalam jaringan. Pendekatan ini didasarkan pada prinsip bahwa senyawa kimia tertentu dapat berikatan selektif dengan target molekuler, menghasilkan perubahan warna yang dapat diamati di bawah mikroskop. Histokimia berperan kritis dalam diagnosis patologi dan penelitian biomedis, karena memungkinkan diferensiasi komponen seluler berdasarkan sifat kimiawinya.

##### **1. Prinsip Dasar Reaksi Kimia-Target**

Prinsip dasar histokimia melibatkan reaksi kimia antara pereaksi pewarna dan komponen target dalam jaringan, seperti protein, karbohidrat, atau lipid. Reaksi ini bergantung pada afinitas selektif pewarna terhadap grup fungsional spesifik (misalnya, gugus amino atau hidroksil). Contohnya, pewarna basa seperti hematoksilin cenderung berikatan dengan komponen asam (e.g., DNA), sedangkan pewarna asam seperti eosin menargetkan komponen basa (e.g., protein sitoplasma). Spesifisitas reaksi dicapai melalui kontrol pH, konsentrasi, dan waktu inkubasi, yang memastikan visualisasi akurat tanpa artefak.

## 2. Pewarnaan Rutin: Hematoksilin dan Eosin (H&E)

Pewarnaan H&E adalah metode rutin dalam histopatologi due to kemampuannya memberikan gambaran umum morfologi jaringan. Hematoksilin, sebagai pewarna basa, mengikat inti sel dan komponen asam lainnya, menghasilkan warna biru-ungu. Eosin, sebagai pewarna asam, menodai sitoplasma dan matriks ekstraseluler dengan warna merah muda. Kombinasi ini memungkinkan identifikasi cepat struktur seluler, seperti nukleus, sitoplasma, dan jaringan ikat, sehingga menjadi dasar untuk diagnosis awal berbagai kondisi patologis.

## 3. Pewarnaan Khusus

Pewarnaan khusus digunakan untuk mendeteksi komponen spesifik yang tidak terlihat jelas dengan H&E. Berikut adalah beberapa contoh utama:

- a. **Untuk Karbohidrat:** PAS (Periodic Acid-Schiff) – Metode ini mengoksidasi gugus gula dengan asam periodat, menghasilkan aldehida yang bereaksi dengan reagen Schiff untuk menghasilkan warna magenta. PAS berguna untuk mengidentifikasi glikogen, mucin, dan membran basal.
- b. **Untuk Lipid:** Oil Red O – Pewarna ini larut dalam lipid dan diaplikasikan pada jaringan beku (karena lipid larut dalam proses parafin), menghasilkan noda merah pada droplet lipid. Aplikasinya termasuk diagnosis steatosis hepatic.
- c. **Untuk Protein Jaringan Ikat:** Masson Trichrome dan Van Gieson – Masson Trichrome menggunakan kombinasi pewarna untuk membedakan kolagen (biru), otot (merah), dan inti (hitam). Van Gieson menekankan kolagen (merah) terhadap latar belakang kuning, berguna dalam studi fibrosis.
- d. **Untuk Mikroorganisme:** Pewarnaan Gram dan Ziehl-Neelsen – Pewarnaan Gram membedakan bakteri Gram-positif (ungu) dan Gram-negatif (merah) berdasarkan perbedaan dinding sel. Ziehl-Neelsen mengidentifikasi

bakteri tahan asam seperti *Mycobacterium tuberculosis* dengan noda merah pada latar belakang biru.

Dengan menerapkan prinsip reaksi kimia-target, histokimia memberikan alat yang tak ternilai untuk analisis jaringan yang presisi dan terstruktur.

## **E. Imunohistokimia: Prinsip dan Teknik**

### **1. Dasar Immunologi: Antigen, Antibodi, Dan Epitop**

Imunohistokimia (IHK) merupakan suatu metode yang berlandaskan prinsip imunologi, khususnya interaksi spesifik antara antigen dan antibodi. Antigen didefinisikan sebagai molekul, umumnya berupa protein atau glikoprotein, yang mampu dikenali oleh sistem imun. Pada struktur antigen terdapat wilayah tertentu yang dikenal sebagai epitop, yaitu determinan antigenik yang menjadi tempat pengikatan antibodi. Antibodi, atau imunoglobulin, merupakan glikoprotein yang diproduksi oleh sel B dan berperan dalam pengenalan epitop spesifik melalui domain variabel pada rantai berat dan ringan. Sifat spesifisitas dan afinitas tinggi dari interaksi antigen-antibodi inilah yang mendasari kemampuan IHK untuk mendeteksi target molekuler pada preparat histologis.

### **2. Sistem Deteksi: Prinsip Labeling (Enzim dan Fluoresen)**

Deteksi hasil ikatan antigen-antibodi dalam IHK memerlukan sistem pelabelan (labeling) yang memungkinkan visualisasi secara mikroskopis. Dua sistem utama yang digunakan adalah pelabelan berbasis enzim dan pelabelan berbasis fluoresen.

Pada sistem berbasis enzim, antibodi dikonjugasikan dengan enzim seperti horseradish peroxidase (HRP) atau alkaline phosphatase (AP). Reaksi enzim dengan substrat kromogen, misalnya 3,3'-diaminobenzidine (DAB) untuk HRP, menghasilkan endapan berwarna pada lokasi antigen sehingga dapat diamati dengan mikroskop cahaya (PERIKANAN, n.d.).

Pada sistem berbasis fluoresen, antibodi dilabeli dengan fluorokrom seperti fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine, atau Alexa Fluor. Fluorokrom tersebut akan memancarkan sinyal fluoresen spesifik ketika tereksitasi oleh panjang gelombang cahaya tertentu, yang selanjutnya dapat dideteksi menggunakan mikroskop fluoresen atau sistem pencitraan konfokal(Is, 2022).

### 3. Teknik Imunohistokimia Langsung dan Tidak Langsung

Metode imunohistokimia dapat dibedakan menjadi dua pendekatan utama, yaitu teknik langsung dan teknik tidak langsung(Nurcahyanti and Kusmardi, 2024).

a. **Teknik langsung** menggunakan antibodi primer yang telah dilabeli dengan enzim atau fluorokrom. Kelebihannya terletak pada prosedur yang lebih singkat serta pengurangan kemungkinan terjadinya ikatan non-spesifik akibat penggunaan antibodi sekunder. Namun, kelemahan metode ini adalah sensitivitas yang relatif rendah, karena hanya terdapat satu label per antibodi.

b. **Teknik tidak langsung** melibatkan antibodi primer yang tidak dilabeli, yang kemudian dikenali oleh antibodi sekunder berlabel. Antibodi sekunder tersebut mampu berikatan dengan berbagai antibodi primer, sehingga menghasilkan amplifikasi sinyal dan sensitivitas yang lebih tinggi. Oleh karena itu, metode tidak langsung lebih banyak digunakan dalam praktik diagnostik dan penelitian.

### 4. Optimalisasi: Antigen Retrieval dan Blocking

Optimalisasi prosedur IHK diperlukan untuk meningkatkan akurasi dan kualitas hasil pewarnaan. Salah satu permasalahan yang sering dijumpai adalah terjadinya maskering epitop akibat proses fiksasi jaringan, khususnya dengan formalin, yang menyebabkan terbentuknya ikatan silang protein. Untuk mengatasi hal tersebut, digunakan prosedur *antigen retrieval*. Metode *heat-induced epitope retrieval* (HIER) dilakukan dengan pemanasan jaringan dalam larutan buffer tertentu (misalnya citrate buffer atau EDTA),

sedangkan metode *enzymatic retrieval* menggunakan enzim proteolitik untuk membuka kembali epitop yang tertutupi.

Selain itu, untuk mencegah pewarnaan latar belakang akibat ikatan non-spesifik, dilakukan proses *blocking* (Warford et al., 2014). Blocking dapat berupa penggunaan serum normal dari spesies yang sesuai, protein non-imunogenik seperti bovine serum albumin (BSA), atau inhibisi aktivitas endogen enzim (misalnya peroksidase endogen) dengan pereaksi khusus. Tahap blocking ini penting untuk memastikan hasil pewarnaan yang spesifik, kontras, dan dapat diinterpretasikan secara akurat.

## F. Aplikasi Imunohistokimia dalam Diagnosis Tumor (Patologi Diagnostik)

### Penentuan Asal Usul Sel

Salah satu peran utama imunohistokimia (IHK) dalam patologi diagnostik adalah membantu menentukan asal usul sel pada suatu neoplasma. Hal ini sangat penting karena banyak tumor menunjukkan gambaran histomorfologi yang tumpang tindih, sehingga identifikasi lineage seluler memerlukan konfirmasi molekuler (Leong and Wright, 1987).

1. **Sitokeratin (CK)** merupakan penanda khas sel epitel dan digunakan untuk mengidentifikasi karsinoma. Ekspresi CK positif pada sel tumor menegaskan diferensiasi epitelial (Jain et al., 2010).
2. **Vimentin** adalah penanda sitoskeletal yang diekspresikan pada jaringan mesenkimal, sehingga digunakan untuk mengenali sarkoma maupun tumor dengan diferensiasi mesenkimal (Battifora, 1991).
3. Kombinasi panel imunomarker (misalnya CK, vimentin, desmin, S-100, GFAP) sering diperlukan untuk mengidentifikasi dengan lebih tepat asal usul sel tumor, terutama pada kasus neoplasma dengan diferensiasi ganda atau fenotipe yang tidak jelas (Metgud et al., 2017).

## Penanda Prognostik dan Prediktif

Selain untuk penentuan lineage seluler, IHK juga berperan penting dalam menilai parameter prognostik maupun prediktif yang memengaruhi keputusan terapeutik.

1. **Pada kanker payudara**, ekspresi reseptor hormon estrogen (ER) dan progesteron (PR) dinilai untuk menentukan kemungkinan respons terhadap terapi hormonal (endokrin) (Nassar et al., 2011).
2. **HER2/neu**, suatu reseptor tirosin kinase, merupakan penanda prediktif penting yang digunakan untuk menentukan indikasi terapi target dengan trastuzumab atau obat sejenis (Koeppen et al., 2001).
3. **Ki-67**, sebuah antigen inti sel yang diekspresikan selama fase aktif siklus sel, digunakan untuk menilai indeks proliferasi. Tingginya indeks Ki-67 berkorelasi dengan agresivitas tumor dan dapat digunakan sebagai indikator prognostik (Chalkidou et al., 2012)

Dengan demikian, penggunaan panel imunomarker tidak hanya memperkuat diagnosis tetapi juga memandu strategi terapi individual yang lebih tepat sasaran.

## Diagnosis Banding Limfoma

Diagnosis limfoma sering kali menghadirkan tantangan diagnostik karena keragaman morfologi serta tumpang tindih dengan reaksi hiperplastik. IHK dengan panel penanda CD (cluster of differentiation) sangat penting dalam membedakan berbagai subtype limfoma.

1. **CD20** merupakan penanda utama sel B, sedangkan **CD3** digunakan untuk mengidentifikasi sel T (Sun et al., 2004).
2. Penanda lain seperti **CD10**, **BCL6**, dan **MUM1** membantu dalam klasifikasi lebih lanjut limfoma sel B, misalnya pada *diffuse large B-cell lymphoma* (DLBCL) (Sundram et al., 2005).
3. **CD5**, **CD23**, dan **Cyclin D1** dapat digunakan untuk membedakan antara *chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma* (CLL/SLL) dan *mantle cell lymphoma*.

Panel penanda tersebut memungkinkan klasifikasi limfoma secara akurat, yang sangat penting mengingat implikasi terapeutik dan prognostik yang berbeda antar subtipe.

### **Aplikasi IHC dalam Metastasis**

Imunohistokimia juga memiliki peran krusial dalam mengevaluasi kasus metastasis, terutama ketika tumor ditemukan pada lokasi sekunder dengan asal primer yang tidak jelas. Identifikasi tumor primer sangat penting karena terapi dan prognosis sangat bergantung pada sumber neoplasma.

1. **Sitokeratin subtipe**, seperti **CK7** dan **CK20**, digunakan sebagai penanda pola ekspresi untuk memperkirakan lokasi asal tumor. Misalnya, profil CK7+/CK20- sering dijumpai pada karsinoma paru dan payudara, sedangkan profil CK7-/CK20+ lebih khas untuk karsinoma kolorektal (Liana et al., 2025).
2. Penanda spesifik jaringan seperti **TTF-1** (thyroid transcription factor-1) pada adenokarsinoma paru dan tiroid, **PSA** (prostate-specific antigen) pada karsinoma prostat, serta **GCDFP-15** atau **Mammaglobin** pada karsinoma payudara, digunakan untuk menegakkan identifikasi tumor primer (Huo et al., 2015).

Dalam kasus metastasis dengan morfologi yang tidak spesifik, panel IHC yang dipilih secara rasional berdasarkan riwayat klinis pasien dan distribusi anatomi lesi sangat membantu dalam mempersempit kemungkinan sumber primer.

## DAFTAR PUSTAKA

- Battifora, H., 1991. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry: the vimentin internal control. *Am. J. Clin. Pathol.* 96, 669–671.
- Bosch, F., Rosich, L., 2008. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* 82, 171–179.
- Bracegirdle, B., 1993. The microscopical tradition. *Companion Encycl. Hist. Med.* 1, 102–119.
- Chalkidou, A., Landau, D., Odell, E., Cornelius, V., O’Doherty, M., Marsden, P., 2012. Correlation between Ki-67 immunohistochemistry and 18F-fluorothymidine uptake in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer* 48, 3499–3513.
- Cocquyt, T., 2022. Positioning Van Leeuwenhoek’s microscopes in 17th-century microscopic practice. *FEMS Microbiol. Lett.* 369, fnac031.
- Coons, A.H., 1956. Histochemistry with labeled antibody, in: *International Review of Cytology*. Elsevier, pp. 1–23.
- Darmayanti, S.N.A., 2024. Revolusi AI. *Maliki Interdiscip. J.* 2, 952–957.
- Huo, L., Gong, Y., Guo, M., Gilcrease, M.Z., Wu, Y., Zhang, H., Zhang, J., Resetkova, E., Hunt, K.K., Deavers, M.T., 2015. GATA-binding protein 3 enhances the utility of gross cystic disease fluid protein-15 and mammaglobin A in triple-negative breast cancer by immunohistochemistry. *Histopathology* 67, 245–254.
- Is, F., 2022. Fluorescein isothiocyanate (FITC).
- Jain, R., Fischer, S., Serra, S., Chetty, R., 2010. The use of cytokeratin 19 (CK19) immunohistochemistry in lesions of the pancreas, gastrointestinal tract, and liver. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 18, 9–15.

- Koeppen, H., Wright, B., Burt, A., Quirke, P., McNicol, A., Dybdal, N., Sliwkowski, M., Hillan, K., 2001. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 38, 96-104.
- Leong, A., Wright, J., 1987. The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis. *Histopathology* 11, 1295-1305.
- Liana, N., Setiawati, Y., Triyana, R., Helmizar, R., 2025. Subtipe Histopatologis Adenokarsinoma Kolorektal Berdasarkan WHO: Implikasi Terhadap Prognosis. *Sci. J.* 4, 166-176.
- McEwan, N.R., 1991. Myelin messenger ribonucleic acids: their association with the cytoskeleton and their subcellular distribution.
- Metgud, R., Naik, S., Patel, S., 2017. Spindle cell lesions: A review on immunohistochemical markers. *J. Cancer Res. Ther.* 13, 412-418.
- Nassar, A., Cohen, C., Agersborg, S.S., Zhou, W., Lynch, K.A., Heyman, E.R., Olson, A., Lange, H., Siddiqui, M.T., 2011. A new immunohistochemical ER/PR image analysis system: a multisite performance study. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 19, 195-202.
- Nurcahyanti, O., Kusmardi, K., 2024. Imunohistokimia pada Kanker Payudara: Teknik, Aplikasi, dan Implikasinya dalam Diagnostik dan Terapi. *Pratista Patol.* 9.
- PERIKANAN, I.B.P.P.P., n.d. DENGAN TEKNIK MOLEKULER.
- Schultz, M., 2008. Rudolf virchow. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1480.
- Sun, T., Akalin, A., Rodacker, M., Braun, T., 2004. CD20 positive T cell lymphoma: is it a real entity? *J. Clin. Pathol.* 57, 442-444.
- Sundram, U., Kim, Y., Mraz-Gernhard, S., Hoppe, R., Natkunam, Y., Kohler, S., 2005. Expression of the bcl-6 and MUM1/IRF4 proteins correlate with overall and disease-specific survival

in patients with primary cutaneous large B-cell lymphoma: a tissue microarray study. *J. Cutan. Pathol.* 32, 227–234.

Warford, A., Akbar, H., Riberio, D., 2014. Antigen retrieval, blocking, detection and visualisation systems in immunohistochemistry: a review and practical evaluation of tyramide and rolling circle amplification systems. *Methods* 70, 28–33.

Ying, W., Wang, D., Hu, X., Qiu, J., Park, J., Fu, Y., 2024. Revolutionizing biomarker discovery: Leveraging generative ai for bio-knowledge-embedded continuous space exploration. Presented at the Proceedings of the 33rd ACM International Conference on Information and Knowledge Management, pp. 5046–5053.

# BAB 14

## KONTROL KUALITAS DALAM HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

dr. Marlina Nurprilinda, M.H.Kes., FISQua.

### A. Pendahuluan

Histokimia adalah cabang ilmu yang mempelajari identifikasi dan distribusi senyawa kimia di dalam dan di antara sel serta jaringan biologis menggunakan teknik histologi dan reaksi kimia khusus. Teknik ini memanfaatkan pewarnaan histologis yang dikombinasikan dengan reaksi kimia spesifik untuk mendeteksi keberadaan komponen kimia seperti protein, karbohidrat, lipid, enzim, dan asam nukleat dalam preparat jaringan. Dengan bantuan mikroskop cahaya atau elektron, histokimia memungkinkan visualisasi lokal dari zat kimia tersebut sehingga memberikan informasi tentang komposisi kimia dan fungsi sel atau jaringan pada tingkat mikroskopis. Teknik ini sangat penting dalam studi biologi sel, botani, dan kedokteran karena dapat memberikan gambaran yang lebih rinci tentang struktur dan fungsi seluler berdasarkan komposisi kimianya.

Imunohistokimia merupakan pengembangan dari teknik histokimia yang menggunakan antibodi spesifik sebagai alat utama dalam mendeteksi antigen tertentu dalam jaringan. Teknik ini memanfaatkan interaksi antigen-antibodi yang sangat spesifik, di mana antibodi primer mengikat antigen target dan antibodi sekunder yang diberi label enzim atau fluorokrom digunakan untuk mendeteksi dan memvisualisasikan lokasi antigen. Imunohistokimia memungkinkan identifikasi protein, reseptor, dan molekul lain dalam konteks struktur jaringan

aslinya, sehingga memberikan informasi tidak hanya tentang keberadaan tetapi juga distribusi spasial molekul tersebut dalam sel. Teknik ini sangat berguna dalam diagnostik patologi, penelitian kanker, dan studi biomedis lainnya karena kemampuannya untuk mendeteksi perubahan molekuler yang berkaitan dengan penyakit.

Kedua teknik ini, histokimia dan imunohistokimia, saling melengkapi dalam analisis jaringan biologis. Histokimia memberikan gambaran umum tentang komposisi kimia jaringan, sementara imunohistokimia menyediakan deteksi yang lebih spesifik dan sensitif terhadap molekul target. Penggunaan keduanya secara tepat dan terintegrasi penting dalam diagnosis laboratorium, riset dasar, dan pengembangan terapi, sehingga kontribusinya terhadap ilmu kedokteran dan biologi sangat besar.

Kontrol kualitas merupakan komponen krusial dalam setiap prosedur laboratorium, khususnya pada teknik histokimia dan imunohistokimia yang digunakan untuk mendeteksi distribusi dan identifikasi molekul pada jaringan biologis. Teknik ini sangat sensitif terhadap berbagai variabel, mulai dari kualitas sampel, reagen, hingga prosedur teknis yang digunakan. Oleh karena itu, penerapan kontrol kualitas yang ketat menjadi langkah penting untuk menjamin hasil yang tidak hanya akurat tetapi juga reproducible, sehingga dapat diandalkan dalam diagnosis klinis dan penelitian biomedis.

Dalam histokimia dan imunohistokimia, kontrol kualitas mencakup penggunaan kontrol positif dan negatif yang konsisten untuk memvalidasi spesifisitas dan sensitivitas reagen, terutama antibodi. Kontrol positif memastikan bahwa reagen dan protokol pewarnaan mampu mendeteksi antigen target dengan baik, sedangkan kontrol negatif menguji kemungkinan reaksi silang dan latar belakang pewarnaan non-spesifik. Kualitas sampel jaringan, termasuk teknik pengambilan, fiksasi, dan pemrosesan, juga sangat memengaruhi hasil. Kesalahan pada tahap ini dapat

menghasilkan artefak atau kehilangan antigen yang signifikan, sehingga merusak validitas interpretasi.

Standarisasi prosedur pewarnaan dan pelatihan operator juga merupakan bagian dari kontrol kualitas untuk mengurangi variabilitas hasil antar laboratorium atau antar batch. Penggunaan peralatan yang terkalibrasi serta lingkungan kerja yang terkendali mendukung konsistensi hasil. Interpretasi hasil yang dilakukan oleh tenaga ahli dengan pengalaman juga meningkatkan keakuratan pembacaan, sehingga hasil pewarnaan dapat dimanfaatkan secara optimal untuk pengambilan keputusan klinis.

Hasil histokimia dan imunohistokimia yang akurat dan reproducible sangat penting dalam diagnosis penyakit, terutama kanker, karena dapat menentukan jenis dan asal tumor, status ekspresi biomarker, serta membantu menentukan pilihan terapi yang tepat. Kesalahan dalam kontrol kualitas dapat menyebabkan diagnosis yang keliru dan berdampak serius pada penanganan pasien. Oleh karena itu, kontrol kualitas bukan hanya prosedur teknis, melainkan bagian integral yang memastikan integritas ilmiah dan keselamatan pasien.

Dengan kemajuan teknologi dan metode baru dalam imunohistokimia, kontrol kualitas juga harus terus ditingkatkan dan disesuaikan. Pengembangan standar internasional dan penggunaan sistem otomatisasi semakin membantu meminimalkan kesalahan manusia dan meningkatkan reproducibility hasil di berbagai pusat diagnostik.

Secara keseluruhan, kontrol kualitas yang baik adalah fondasi utama untuk menjamin hasil histokimia dan imunohistokimia yang dapat dipercaya. Hal ini krusial untuk menjamin validitas data ilmiah dan menjadi dasar bagi keberhasilan diagnosis dan terapi yang optimal.

Tujuan dari bab ini adalah untuk memahami pentingnya menjaga standar dan konsistensi dalam proses pewarnaan dan analisis jaringan agar menghasilkan data yang akurat, reproducible, dan dapat diandalkan. Bab ini bertujuan menjelaskan bagaimana implementasi kontrol kualitas

meminimalkan kesalahan teknis dan variasi antar sampel atau batch, sehingga memastikan validitas hasil diagnostik dan penelitian. Selain itu, bab ini juga membahas pentingnya penggunaan kontrol positif dan negatif, validasi reagen seperti antibodi, serta standarisasi protokol dan pelatihan operator sebagai bagian dari upaya mempertahankan mutu hasil pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia. Dengan demikian, bab ini memberi landasan praktis dan teoritis untuk memastikan hasil pemeriksaan yang berkualitas tinggi, yang sangat krusial dalam pengambilan keputusan klinis, terutama dalam diagnosis dan penentuan terapi penyakit seperti kanker.

## **B. Prinsip Dasar Kontrol Kualitas**

Kontrol kualitas dalam konteks histokimia dan imunohistokimia didefinisikan sebagai serangkaian prosedur dan aktivitas teknis yang dilakukan secara sistematis untuk memantau, mengevaluasi, dan mengendalikan faktor-faktor yang dapat memengaruhi akurasi, presisi, dan keandalan hasil pemeriksaan laboratorium. Kontrol kualitas bertujuan untuk memastikan bahwa proses analitik—mulai dari persiapan sampel, pewarnaan, hingga interpretasi hasil—berjalan sesuai standar yang ditetapkan sehingga menghasilkan data yang valid dan dapat dipercaya. Dalam praktiknya, kontrol kualitas meliputi penggunaan bahan kontrol positif dan negatif, pengecekan fungsi alat, validasi reagen seperti antibodi, serta pelatihan dan evaluasi kompetensi operator. Dengan demikian, kontrol kualitas menjadi bagian penting dari jaminan mutu laboratorium yang berkontribusi terhadap keakuratan diagnosis dan pengambilan keputusan klinis, khususnya pada pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia.

Kualitas hasil pewarnaan dalam histokimia dan imunohistokimia sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, yang jika tidak diperhatikan dengan baik dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat, tidak konsisten, dan sulit untuk direproduksi. Faktor-faktor utama tersebut meliputi:

## **1. Sampel**

Kualitas sampel merupakan salah satu faktor penentu terbesar. Teknik pengambilan sampel yang tepat, proses fiksasi yang optimal, serta penanganan dan penyimpanan jaringan sangat menentukan keberhasilan pewarnaan. Fiksasi yang buruk atau terlambat dapat menyebabkan degradasi antigen dan perubahan struktur sel, sehingga menghasilkan sinyal pewarnaan yang lemah atau palsu negatif. Preparasi jaringan, seperti pemotongan irisan yang seragam dan penyisipan yang benar dalam media, juga sangat penting untuk memastikan distribusi antigen yang tepat dan keterbacaan hasil di bawah mikroskop.

## **2. Reagen**

Penggunaan reagen berkualitas tinggi dan validasi antibodi primer dan sekunder adalah kunci dalam imunohistokimia. Antibodi harus memiliki afinitas dan spesifisitas tinggi terhadap antigen target untuk menghindari ikatan non-spesifik dan memberikan sinyal yang jelas. Kesalahan dalam penyimpanan, kontaminasi, atau penggunaan reagen kedaluwarsa dapat mengurangi efektivitas reagen tersebut. Selain itu, kontrol positif dan negatif harus digunakan sebagai bagian dari protokol untuk memastikan reagen bekerja sesuai harapan.

## **3. Teknik**

Prosedur pewarnaan harus distandarisasi dan dioptimalkan, termasuk waktu inkubasi, suhu, konsentrasi antibodi, dan metode deteksi. Penggunaan metode yang tepat seperti metode langsung atau tidak langsung, serta teknik amplifikasi sinyal, dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas. Proses blocking untuk mengurangi latar belakang pewarnaan non-spesifik juga sangat penting. Kesalahan teknis dalam tahapan ini dapat menyebabkan artefak, hasil tidak konsisten, atau sinyal yang gagal dideteksi.

#### **4. Operator**

Pengalaman dan keterampilan operator dalam menjalankan prosedur dan interpretasi hasil sangat mempengaruhi kualitas. Pelatihan berkelanjutan dan pemahaman tentang prinsip dasar teknik serta potensi error sangat diperlukan. Interpretasi hasil pewarnaan yang dilakukan oleh laboran dan ahli patologi dengan keahlian memadai akan meminimalkan risiko kesalahan diagnosis.

Secara keseluruhan, perhatian yang seksama terhadap faktor-faktor ini menjamin hasil pewarnaan histokimia dan imunohistokimia yang valid, akurat, dan reproducible, yang sangat penting untuk diagnosis klinis dan penelitian ilmiah.

### **C. Aspek-Aspek Kontrol Kualitas**

Kontrol kualitas adalah rangkaian prosedur yang bertujuan untuk menjamin bahwa proses analisis dan hasil pemeriksaan laboratorium dapat dipercaya, akurat, dan konsisten. Dalam histokimia dan imunohistokimia, aspek-aspek kontrol kualitas yang perlu diperhatikan meliputi beberapa komponen utama sebagai berikut:

#### **1. Kualitas Sampel**

Pengambilan, fiksasi, dan penyimpanan jaringan sangat menentukan hasil pewarnaan. Proses fiksasi yang buruk dapat menyebabkan degradasi antigen dan perubahan morfologi, sehingga memberikan hasil pewarnaan yang tidak representatif. Persiapan irisan jaringan (mikrotomi) yang tepat dengan ketebalan seragam juga penting untuk memastikan penetrasi reagen dan keterbacaan hasil di bawah mikroskop.

#### **2. Reagen dan Antibodi**

Validasi dan penyimpanan reagen, terutama antibodi primer dan sekunder dalam imunohistokimia, sangat penting. Reagen harus diuji sensitivitas dan spesifisitasnya menggunakan kontrol positif dan negatif. Penggunaan reagen yang sudah kadaluarsa atau tercemar dapat menyebabkan pewarnaan non-spesifik atau lemah.

### **3. Prosedur Teknikal**

Standarisasi protokol pewarnaan termasuk durasi inkubasi, konsentrasi reagen, suhu, serta langkah blocking untuk mengurangi latar belakang harus dipatuhi agar hasil reproducible. Kesalahan prosedur seperti waktu inkubasi yang kurang atau berlebihan dapat mempengaruhi intensitas dan ketajaman warna.

### **4. Peralatan Laboratorium**

Peralatan yang digunakan harus terkalibrasi, bersih, dan dirawat secara berkala. Alat mikroskop, pipet, inkubator, dan mesin pewarna otomatis harus dalam kondisi baik untuk mencegah kesalahan teknis.

### **5. Pengaruh Operator**

Keterampilan dan pengalaman teknisi dalam menjalankan prosedur dan menafsirkan hasil sangat berpengaruh. Pelatihan rutin dan evaluasi kompetensi operator dapat mengurangi variabilitas hasil dan meningkatkan akurasi diagnosis.

### **6. Dokumentasi dan Pelaporan**

Pencatatan yang sistematis mengenai sampel, reagen, protokol yang dipakai, dan hasil kontrol harus dilakukan dengan baik. Dokumentasi ini penting untuk pelacakan dan audit mutu.

Implementasi aspek-aspek kontrol kualitas ini secara konsisten akan meningkatkan akurasi, presisi, dan keandalan hasil histokimia dan imunohistokimia yang esensial dalam diagnosis klinis dan penelitian laboratorium.

## **D. Kualitas Sampel**

### **1. Teknik Pengambilan Sampel Jaringan**

Teknik pengambilan sampel jaringan merupakan langkah pertama dan sangat krusial dalam proses analisis histokimia dan imunohistokimia. Kualitas sampel jaringan yang diambil secara langsung memengaruhi validitas dan akurasi hasil pemeriksaan. Sampel harus diambil dengan cara yang benar dan sesuai prosedur agar struktur jaringan

dan komponen molekuler tetap terjaga dan representatif terhadap kondisi biologis yang akan dianalisis.

Metode pengambilan sampel bisa berupa biopsi, baik biopsi insisional, eksisional, biopsi jarum halus (Fine Needle Aspiration Biopsy - FNAB), maupun teknik lain sesuai kebutuhan klinis. Teknik ini harus mempertimbangkan lokasi dan ukuran lesi, serta kondisi pasien agar mengurangi risiko kerusakan jaringan dan komplikasi. Pengerjaan pengambilan sampel yang tepat, seperti pengendalian sudut tusukkan jarum dan penentuan kedalaman target untuk biopsi jarum, sangat menentukan kualitas sampel yang diperoleh.

Setelah pengambilan, proses fiksasi harus segera dilakukan untuk mencegah degradasi sel dan antigen. Waktu dan jenis fiksatif yang digunakan sangat penting, karena fiksasi yang tidak optimal dapat menyebabkan artefak, hilangnya antigen, dan perubahan morfologi jaringan yang merugikan analisis histokimia selanjutnya. Selain itu, penanganan sampel selama proses transportasi dan penyimpanan juga harus dilakukan dengan hati-hati untuk menjaga stabilitas jaringan dan mencegah kontaminasi.

Pemotongan irisan jaringan menggunakan mikrotom harus dilakukan secara rapi dengan ketebalan standar (biasanya sekitar 4-5 mikrometer) untuk mendapatkan preparat yang seragam. Ketebalan irisan yang tidak tepat dapat mempengaruhi penetrasi reagen pewarnaan dan distribusi sinyal pada preparat, sehingga menghasilkan hasil yang tidak konsisten.

Secara keseluruhan, teknik pengambilan sampel jaringan yang berkualitas tinggi sangat penting untuk mendapatkan data histokimia dan imunohistokimia yang valid dan dapat diandalkan dalam diagnosis dan penelitian.

## **2. Fiksasi dan Pengawetan Jaringan untuk Mencegah Degradasi Antigen**

Fiksasi adalah tahap awal dan sangat penting dalam proses preparasi jaringan untuk pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia. Tujuan utama fiksasi adalah mengawetkan struktur sel dan jaringan agar menyerupai kondisi fisiologisnya sehingga dapat mempertahankan morfologi dan komponen molekuler seperti antigen agar tidak rusak atau terdegradasi selama proses analisis.

Secara kimiawi, fiksasi bekerja dengan mengubah komposisi kimia jaringan melalui proses koagulasi protein dan pembentukan ikatan silang (cross-linking) antara protein jaringan dan cairan fiksatif, seperti formalin. Ikatan silang ini menciptakan struktur jaringan yang stabil dan tahan terhadap larutan-larutan selama pemrosesan, memudahkan penetrasi reagen pewarnaan, dan mencegah autolisis dan putrefaksi jaringan yang dapat merusak antigen. Selain itu, aktivitas enzim yang dapat memecah jaringan juga dihambat selama fiksasi.

Ada beberapa tipe fiksasi, yaitu fiksasi kimia dan fiksasi fisik. Fiksasi kimia yang paling umum digunakan dalam laboratorium histopatologi adalah formalin buffer netral 10%, yang dianggap efektif mempertahankan antigen dan struktur jaringan. Faktor yang memengaruhi efektivitas fiksasi meliputi pH larutan fiksatif (idealnya netral pada pH 6-8), suhu (biasanya suhu kamar), rasio volume fiksatif terhadap jaringan (disarankan 20:1), ketebalan jaringan yang akan difiksasi (3-4 mm ideal), dan lamanya waktu fiksasi (biasanya beberapa jam hingga 24 jam).

Pemilihan dan penggunaan protokol fiksasi yang tepat sangat penting untuk mencegah degradasi antigen, yang dapat mengakibatkan hasil pewarnaan imunohistokimia yang lemah atau salah interpretasi. Jaringan yang kurang difiksasi dengan baik dapat mengalami denaturasi antigen, sedangkan fiksasi yang berlebihan juga dapat menyebabkan masking antigen sehingga sulit dikenali antibodi.

Dengan demikian, proses fiksasi yang optimal adalah langkah kritis dalam menjaga kualitas preparat jaringan, mempertahankan integritas antigen, dan menghasilkan hasil histokimia dan imunohistokimia yang akurat dan reproducible.

### **3. Persiapan dan Pemotongan Irisan Jaringan (Mikrotom)**

Pemotongan irisan jaringan merupakan tahap krusial dalam proses pembuatan preparat histologi untuk analisis mikroskopis. Setelah jaringan mengalami fiksasi dan proses embedding atau penanaman dalam parafin, blok jaringan parafin inilah yang akan dipotong menggunakan mikrotom. Mikrotom adalah alat presisi yang mampu mengiris jaringan menjadi irisan tipis dengan ketebalan berkisar antara 3-5 mikrometer, yang sangat diperlukan agar sinyal pewarnaan dapat dikenali dengan jelas dan hasil pengamatan mikroskopis menjadi optimal.

Persiapan pemotongan dimulai dengan memastikan pisau mikrotom tajam dan dalam kondisi baik agar irisan jaringan rapi tanpa robek atau terdistorsi. Blok parafin yang berisi jaringan dipasang pada holder mikrotom, diatur dengan sudut dan ketebalan irisan yang sesuai kebutuhan. Teknik pemotongan dilakukan dengan hati-hati untuk menghasilkan irisan yang rata dan bebas dari lipatan agar pewarnaan seragam dan interpretasi hasil menjadi akurat.

Setelah irisan jaringan terpotong, irisan tersebut biasanya diangkat menggunakan kuas atau metode manual, kemudian diletakkan pada slide kaca yang telah dilapisi perekat seperti gelatin atau poly-L-lysine agar irisan tidak mudah lepas selama proses pewarnaan. Irisan tersebut kemudian diapung di atas waterbath pada suhu sekitar 37-40°C untuk menghilangkan kerutan dan meluruskan jaringan sebelum dikeringkan dan disimpan atau langsung diwarnai.

Berbagai jenis mikrotom tersedia tergantung kebutuhan, seperti mikrotom manual, rotary microtome, sliding microtome, dan freezing microtome yang digunakan

untuk teknik cryosectioning pada jaringan beku. Pemilihan mikrotom disesuaikan dengan jenis jaringan, tujuan analisis, dan metode pewarnaan yang akan digunakan.

Secara keseluruhan, persiapan dan pemotongan irisan jaringan dengan mikrotom yang tepat adalah langkah fundamental untuk menghasilkan preparat histologis yang berkualitas tinggi, memungkinkan interpretasi diagnostik yang tepat dan dapat diandalkan dalam penelitian maupun klinik.

#### **E. Kontrol Reagen dan Antibodi**

Kontrol reagen dan antibodi merupakan aspek penting dalam menjaga mutu hasil pewarnaan pada teknik histokimia dan imunohistokimia. Reagen yang digunakan, terutama antibodi primer dan sekunder, harus divalidasi dan dikontrol secara ketat untuk memastikan bahwa mereka bereaksi secara spesifik dan sensitif terhadap target antigen tanpa menimbulkan reaksi silang atau pewarnaan non-spesifik.

Validasi antibodi mencakup pengujian sensitivitas dan spesifisitas pada sampel kontrol positif dan negatif yang diketahui mengandung atau tidak mengandung antigen target. Penggunaan kontrol positif memastikan antibodi mampu mendeteksi antigen pada jaringan nyata, sedangkan kontrol negatif digunakan untuk mengidentifikasi latar belakang pewarnaan dan false positive yang mungkin terjadi akibat ikatan non-spesifik.

Penyimpanan dan penanganan reagen harus sesuai dengan petunjuk produsen, seperti suhu dan waktu penyimpanan yang direkomendasikan, untuk mencegah degradasi dan kehilangan aktivitas antibodi. Penggunaan reagen kadaluwarsa atau tercemar dapat menimbulkan hasil yang tidak akurat dan membingungkan interpretasi.

Selain itu, konsistensi batch reagen juga harus diawasi. Perbedaan antar batch dapat menyebabkan variasi hasil, sehingga penting untuk melakukan uji kontrol mutu pada setiap batch baru reagen yang digunakan. Dokumentasi penggunaan

reagen dan pencatatan batch juga menjadi bagian dari kontrol kualitas laboratorium.

Kontrol reagen dan antibodi yang ketat menjamin keandalan hasil pewarnaan, yang sangat berkaitan langsung dengan akurasi diagnosis dan penelitian. Oleh karena itu, laboratorium harus menerapkan standar prosedur operasi (SOP) yang ketat dalam pengelolaan dan validasi reagen serta training yang memadai bagi petugas laboratorium.

Dalam teknik imunohistokimia, penggunaan antibodi primer dan sekunder yang tepat sangat penting untuk mendapatkan hasil yang spesifik dan akurat. Oleh karena itu, proses validasi dan verifikasi antibodi menjadi langkah krusial dalam kontrol kualitas laboratorium.

## **1. Validasi dan Verifikasi Antibodi Primer dan Sekunder**

### **Validasi Antibodi Primer**

Antibodi primer adalah antibodi yang secara langsung mengikat antigen target di jaringan. Validasi antibodi primer dilakukan dengan menguji spesifisitas dan sensitivitas antibodi terhadap antigen target di sampel kontrol positif dan negatif. Antibodi harus mampu mengenali epitope antigen secara spesifik tanpa berikatan silang dengan protein lain yang tidak diinginkan yang dapat menyebabkan pewarnaan latar belakang. Pengujian ini dilakukan dengan berbagai konsentrasi antibodi dan metode deteksi untuk menentukan kondisi optimal yang menghasilkan sinyal kuat dan bersih. Validasi juga mempertimbangkan jenis sampel (seperti jaringan beku atau parafin) dan metode pengolahan jaringan, karena perbedaan ini memengaruhi aksesibilitas antigen.

### **Verifikasi Antibodi Sekunder**

Antibodi sekunder digunakan untuk mendeteksi dan meningkatkan sinyal hasil pengikatan antibodi primer. Antibodi ini biasanya dikonjugasi dengan enzim (seperti HRP atau AP) atau fluorofor. Verifikasi antibodi sekunder meliputi pengujian reaktivitas spesifik terhadap antibodi primer yang digunakan dan meminimalkan reaksi silang dengan protein lain, termasuk immunoglobulin endogen

pada sampel. Penting bahwa antibodi sekunder dihasilkan dari spesies inang yang berbeda dari antibodi primer untuk menghindari pengikatan non-spesifik. Protokol pengujian mencakup penggunaan kontrol positif dan negatif untuk memastikan antibodi sekunder berfungsi optimal tanpa menghasilkan pewarnaan non-spesifik yang dapat membingungkan interpretasi hasil.

Selama proses validasi dan verifikasi, harus dilakukan kontrol positif (sampel yang diketahui mengandung antigen) dan kontrol negatif (penghilangan antibodi primer atau penggunaan jaringan yang tidak mengandung antigen) untuk memeriksa keakuratan dan spesifisitas reaksi imun.

Validasi dan verifikasi antibodi primer dan sekunder menjamin keandalan hasil imunohistokimia, meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi antigen, serta mengurangi kemungkinan kesalahan interpretasi yang dapat berdampak pada diagnosis dan penelitian.

## **2. Penggunaan Kontrol Positif dan Negatif dalam Imunohistokimia**

Dalam teknik imunohistokimia, kontrol positif dan negatif digunakan untuk memastikan validitas, spesifisitas, dan sensitivitas hasil pewarnaan antibodi terhadap antigen target dalam jaringan.

**Kontrol Positif** adalah sampel jaringan yang diketahui mengandung antigen target yang akan dideteksi. Kontrol ini berfungsi sebagai tolok ukur untuk memastikan bahwa antibodi primer dan prosedur pewarnaan bekerja dengan efektif. Contohnya, jika antibodi digunakan untuk mendeteksi reseptor estrogen (ER) pada kanker payudara, jaringan yang sudah diketahui mengekspresikan ER digunakan sebagai kontrol positif. Pewarnaan yang positif pada kontrol ini menandakan reagen dan teknik pewarnaan berjalan dengan baik, sehingga hasil pada sampel uji dapat dipercaya.

**Kontrol Negatif** berfungsi untuk memeriksa pewarnaan non-spesifik dan potensi latar belakang pada sampel. Kontrol ini biasanya berupa jaringan yang tidak mengandung antigen target, atau sampel diwarnai tanpa menggunakan antibodi primer (dengan hanya antibodi sekunder atau tanpa antibodi sama sekali). Tidak adanya pewarnaan signifikan pada kontrol negatif menandakan bahwa reaksi pewarnaan pada sampel uji merupakan reaksi spesifik antibodi terhadap antigen. Jika pengendalian negatif menunjukkan pewarnaan, itu mengindikasikan kemungkinan reaksi silang atau artefak, yang harus diwaspadai dan dicek ulang.

Penggunaan kedua jenis kontrol ini sangat penting agar hasil imunohistokimia terverifikasi secara ilmiah, meningkatkan akurasi diagnosis, dan menghindari kesalahan interpretasi yang dapat berakibat pada keputusan klinis yang salah. Dengan kontrol positif dan negatif yang tepat, validitas pewarnaan dan kredibilitas hasil pemeriksaan dapat dipertahankan.

### **3. Penyimpanan dan Penanganan Reagen**

Penyimpanan dan penanganan reagen yang tepat sangat penting untuk menjaga stabilitas, potensi, dan keamanan bahan kimia yang digunakan dalam prosedur histokimia dan imunohistokimia. Reagen yang rusak atau terkontaminasi dapat menurunkan kualitas hasil pewarnaan dan mengakibatkan interpretasi yang salah.

Beberapa ketentuan penting dalam penyimpanan reagen meliputi:

- a. Suhu Penyimpanan: Sebagian besar reagen penyimpanan dilakukan pada suhu 2-8°C (lemari es) untuk menjaga kestabilan enzim dan antibodi. Beberapa reagen mungkin membutuhkan penyimpanan pada suhu beku (-20°C atau lebih rendah) tergantung pada instruksi produsen. Penting untuk selalu memeriksa lembar teknis (SDS) dari tiap reagen.

- b. Pelarut dan Wadah: Reagen cair umumnya disimpan dalam botol kaca berwarna gelap untuk melindungi dari cahaya yang dapat merusak stabilitas kimia dan biologis reagen. Wadah harus tertutup rapat agar tidak terkontaminasi oleh udara atau partikel lain.
- c. Label dan Dokumentasi: Setiap wadah reagen harus diberi label yang jelas berisi nama reagen, tanggal penerimaan dan pembuatan, nomor batch, tanggal kadaluarsa, serta petunjuk penyimpanan. Label ini penting untuk pemantauan kualitas dan pengelolaan stok reagen.
- d. Penanganan: Reagen harus diambil menggunakan alat steril dan sesuai prosedur untuk menghindari kontaminasi silang. Jika reagen dipersiapkan dalam bentuk aliquot, aliquot harus segera disimpan kembali di suhu yang direkomendasikan dan digunakan dalam waktu tertentu sesuai petunjuk.
- e. Stabilitas dan Umur Simpan: Disarankan untuk membeli reagen dalam jumlah sesuai kebutuhan agar tidak menyimpan reagen terlalu lama yang dapat menurunkan aktivitasnya. Monitoring berkala terhadap performa reagen melalui kontrol kualitas internal membantu mendeteksi adanya penurunan kualitas.

Dengan penyimpanan dan penanganan yang tepat, reagen akan tetap berada dalam kondisi optimal, mendukung validitas dan reproducibility hasil pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia.

## **F. Prosedur Pewarnaan**

### **1. Standarisasi Protokol Pewarnaan**

Standarisasi protokol pewarnaan adalah proses penetapan dan penerapan prosedur yang konsisten dan terkontrol dalam setiap langkah pewarnaan histokimia dan imunohistokimia. Tujuan utamanya adalah untuk menghasilkan teknik pewarnaan yang reproducible, akurat, dan dapat diandalkan sehingga hasil pemeriksaan bisa

dipertanggungjawabkan baik dalam konteks diagnosis klinis maupun penelitian.

Beberapa aspek penting dalam standarisasi protokol pewarnaan meliputi:

a. Persiapan Sampel dan Fiksasi

Standar pengambilan dan fiksasi jaringan yang konsisten mempengaruhi preservasi antigen dan struktur seluler. Fiksasi yang sesuai dengan waktu dan tipe fiksatif seperti formalin buffered 10% adalah penting agar antigen tetap stabil dan dapat dikenali.

b. Antigen Retrieval (Pengembalian Antigen)

Protokol antigen retrieval harus distandarisasi, baik dengan metode pemanasan (heat-induced epitope retrieval/HIER) atau enzim (protease-induced epitope retrieval/PIER), untuk memecahkan cross-linking protein akibat fiksasi dan memaparkan epitope antigen agar antibodi dapat mengikatnya secara optimal.

c. Penggunaan Antibodi Primer dan Sekunder

Konsentrasi, waktu inkubasi, dan suhu harus distandarisasi untuk menghasilkan pewarnaan yang optimal. Validasi tiap batch antibodi juga menjadi bagian dari standar untuk menjaga sensitivitas dan spesifisitas.

d. Blokir Non-Spesifik dan Penghilangan Background

Metode blocking untuk mengurangi ikatan non-spesifik dan background staining harus diatur secara ketat, menggunakan serum normal atau protein blocking agent tertentu pada durasi dan kondisi yang konstan.

e. Proses Pewarnaan Pengembangan Sinyal

Penggunaan kromogen atau fluorofor harus distandarisasi, bersama dengan waktu inkubasi substrat dan pencucian, agar hasil warna atau fluoresensi konsisten.

f. Kontrol Kualitas dan Validasi Hasil

Setiap pewarnaan harus disertai dengan kontrol positif dan negatif untuk memastikan efektivitas pewarnaan, serta pengulangan uji jika diperlukan untuk menjamin reproducibility.

Standarisasi ini juga mencakup pelatihan personel laboratorium dan penggunaan peralatan yang terkalibrasi untuk meminimalkan variabilitas prosedur dan interpretasi hasil. Dengan standarisasi protokol, laboratorium dapat meningkatkan kualitas data yang dihasilkan serta mendukung akurasi diagnosis dan kredibilitas penelitian biomedis.

**2. Optimasi Waktu Inkubasi dan Konsentrasi Reagen**

Optimasi waktu inkubasi dan konsentrasi reagen, terutama antibodi primer dan sekunder, adalah langkah penting dalam memastikan hasil pewarnaan yang optimal, spesifik, dan reproducible dalam prosedur histokimia dan imunohistokimia. Kedua parameter ini saling berkaitan dan berdampak langsung pada sensitivitas dan spesifisitas deteksi antigen dalam jaringan.

**Waktu inkubasi** harus cukup untuk memungkinkan interaksi yang maksimal antara antibodi dan antigen target. Inkubasi yang terlalu singkat dapat menghasilkan ikatan yang tidak lengkap sehingga intensitas pewarnaan rendah, sementara inkubasi yang terlalu lama dapat meningkatkan reaksi non-spesifik dan latar belakang pewarnaan (background staining), yang memperburuk kualitas hasil.

Berbagai penelitian mendukung kebutuhan menyesuaikan waktu inkubasi berdasarkan konsentrasi antibodi. Misalnya, konsentrasi antibodi yang lebih tinggi memerlukan waktu inkubasi yang lebih singkat (sekitar 30 menit), sedangkan konsentrasi antibodi lebih encer membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama (hingga 90 menit atau lebih) untuk mencapai saturasi ikatan. Inkubasi juga bisa dilakukan pada suhu kamar atau pendinginan (4°C) untuk mengendalikan laju reaksi.

**Konsentrasi reagen (antibodi)** merupakan faktor kunci yang menentukan kekuatan sinyal dan tingkat background. Konsentrasi tinggi dapat meningkatkan sensitivitas, tetapi juga risiko reaksi non-spesifik, sedangkan konsentrasi rendah mengurangi kemungkinan false positive namun berisiko menghasilkan sinyal yang lemah. Oleh karena itu, titrasi antibodi untuk mencari konsentrasi optimal yang memberikan pewarnaan kuat dan spesifik dengan latar belakang minimal adalah prosedur standar laboratorium.

### **Pengaruh Bersama Waktu Inkubasi dan Konsentrasi**

Optimasi dilakukan secara bersamaan antara waktu inkubasi dan konsentrasi untuk mencapai keseimbangan terbaik. Sebagai contoh, pada antibodi HER2 dalam imunohistokimia kanker payudara, konsentrasi 1:50 dengan waktu inkubasi 30 menit memberikan hasil yang baik, sedangkan konsentrasi 1:150 membutuhkan waktu inkubasi 90 menit untuk hasil serupa. Pendekatan ini memungkinkan efisiensi waktu sekaligus penghematan reagen.

Kesimpulannya, pemilihan dan pengaturan waktu inkubasi serta konsentrasi reagen yang tepat sangat penting untuk menghasilkan pewarnaan histokimia dan imunohistokimia yang akurat dan dapat diandalkan. Prosedur optimasi harus menjadi bagian standar dari protokol laboratorium untuk memastikan kualitas diagnostik dan penelitian yang tinggi.

## **3. Penggunaan Metode Langsung dan Tidak Langsung**

Dalam laboratorium histokimia dan imunohistokimia, metode langsung dan tidak langsung adalah teknik utama yang digunakan untuk mendeteksi antigen spesifik pada jaringan dengan menggunakan antibodi.

### **a. Metode Langsung (Direct Method)**

Metode langsung menggunakan antibodi primer yang sudah dikonjugasikan atau dilabeli langsung dengan molekul indikator seperti enzim peroksidase atau fluorokrom (misalnya FITC). Antibodi primer ini langsung mengikat antigen target di jaringan, dan

kemudian keberadaan antigen dapat dideteksi melalui sinyal yang dihasilkan oleh label tersebut.

Kelebihan metode langsung ini meliputi proses yang lebih cepat, prosedur lebih sederhana karena hanya melibatkan satu jenis antibodi, serta mengurangi risiko kesalahan teknis akibat lebih sedikit langkah. Namun, metode ini cenderung kurang sensitif dibandingkan metode tidak langsung karena tidak ada amplifikasi sinyal. Oleh karena itu, metode langsung cocok digunakan untuk deteksi antigen yang diekspresikan dalam jumlah tinggi atau dalam kondisi yang membutuhkan hasil cepat.

b. Metode Tidak Langsung (Indirect Method)

Metode tidak langsung melibatkan dua tahap: pertama, antibodi primer yang tidak berlabel mengenali dan berikatan dengan antigen. Kedua, antibodi sekunder yang sudah berlabel dan spesifik terhadap antibodi primer tersebut akan mengikat antibodi primer. Antibodi sekunder biasanya dilabeli dengan enzim atau fluorokrom.

Keunggulan utama metode ini adalah sensitivitas yang lebih tinggi karena satu antibodi primer dapat dikenali oleh beberapa antibodi sekunder, sehingga terjadi amplifikasi sinyal yang memungkinkan deteksi antigen dengan ekspresi rendah. Selain itu, metode tidak langsung lebih fleksibel karena satu antibodi sekunder berlabel dapat digunakan untuk berbagai antibodi primer dari spesies yang sama. Walau lebih sensitif, metode ini memerlukan waktu lebih lama dan prosedur yang lebih rumit karena ada lebih banyak tahap inkubasi dan pencucian, sehingga potensi kesalahan teknis juga lebih tinggi.

Secara ringkas, pemilihan antara metode langsung dan tidak langsung didasarkan pada kebutuhan sensitivitas hasil, waktu analisis yang tersedia, serta kompleksitas sampel. Dalam praktik klinis dan riset, metode tidak langsung lebih

umum digunakan karena keunggulan sensitivitasnya, sedangkan metode langsung dipilih untuk aplikasi spesifik yang memerlukan kecepatan dan kesederhanaan.

### **G. Interpretasi dan Dokumentasi**

Interpretasi hasil pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia merupakan tahap kritis yang menentukan keberhasilan diagnostik dan validitas penelitian. Hasil pewarnaan dievaluasi berdasarkan intensitas warna, distribusi antigen, serta lokasi pewarnaan yang spesifik pada organel atau struktur jaringan seperti membran, sitoplasma, atau inti sel.

Interpretasi standar dilakukan dengan mengamati beberapa kriteria, antara lain:

1. Intensitas Pewarnaan: Tingkat kecerahan warna yang menunjukkan seberapa banyak antigen diekspresikan. Biasanya dinilai dalam skala dari negatif (tanpa warna) hingga kuat (warna pekat).
2. Proporsi Sel Positif: Persentase sel yang menunjukkan warna positif terhadap total sel yang diamati.
3. Lokasi Pewarnaan: Penilaian apakah pewarnaan terjadi pada lokasi biologis yang sesuai, misalnya membran sel untuk beberapa reseptor atau inti sel untuk faktor transkripsi.
4. Pola Pewarnaan: Apakah warna tersebar merata, patchy, atau pada area spesifik tertentu yang mendukung diagnosis.

Pengklasifikasian hasil ini kemudian digunakan untuk memberikan skor atau grading yang membantu dokter dalam menentukan diagnosis, prognosis, dan terapi, khususnya pada kanker dan penyakit imunopatologis.

Dokumentasi hasil merupakan bagian dari kendali mutu, dimana seluruh data pengamatan dicatat secara sistematis termasuk deskripsi, foto mikroskopis, kode sampel, jenis reagen yang digunakan, dan kontrol yang dipakai. Dokumentasi yang lengkap memudahkan audit, review ulang, dan konsultasi antar ahli, sehingga memperkuat akurasi diagnosis.

Selain itu, penggunaan sistem digital untuk penyimpanan dan analisis gambar mikroskopis semakin berkembang, mendukung interpretasi yang lebih objektif dan reproducible dengan teknologi image analysis.

Interpretasi dan dokumentasi yang teliti dan sistematis adalah kunci untuk menjamin hasil laboratorium histokimia dan imunohistokimia yang valid, berkualitas, dan bermanfaat bagi pengambilan keputusan klinis dan penelitian.

### **1. Standar Interpretasi Hasil Pewarnaan**

Standar interpretasi hasil pewarnaan merupakan pedoman penting yang mengatur bagaimana hasil pemeriksaan histokimia dan imunohistokimia dievaluasi secara objektif, konsisten, dan dapat dipertanggungjawabkan. Interpretasi ini didasarkan pada kombinasi parameter kualitatif dan kuantitatif yang berkaitan dengan ekspresi antigen dalam sampel jaringan.

Beberapa aspek utama dalam standar interpretasi meliputi:

#### **a. Intensitas Pewarnaan**

Menilai kekuatan warna yang dihasilkan pada jaringan, biasanya dikategorikan dalam skala seperti negatif, lemah, sedang, dan kuat. Intensitas ini mencerminkan tingkat ekspresi antigen yang dapat dikorelasikan dengan aktivitas biologis protein target.

#### **b. Persentase Sel Positif**

Menghitung proporsi sel di dalam preparat yang menunjukkan pewarnaan positif terhadap jumlah total sel yang diperiksa. Pengukuran ini memberikan gambaran kuantitatif tentang ekspresi antigen dalam populasi sel.

#### **c. Lokasi Pewarnaan**

Memastikan pewarnaan terjadi pada lokasi biologis yang sesuai seperti membran sel, sitoplasma, atau inti yang relevan dengan jenis antigen yang dideteksi. Misalnya, reseptor hormon biasanya diekspresikan pada membran sel, sehingga pewarnaan yang tepat harus terlihat di area tersebut.

d. Sistem Skoring yang Digunakan

Terdapat berbagai sistem skoring yang digunakan secara luas dalam interpretasi imunohistokimia, seperti:

- 1) Skor Allred: Menggabungkan intensitas pewarnaan dan persentase sel positif ke dalam skor total antara 0 hingga 8, sering digunakan untuk reseptor hormon pada kanker payudara.
- 2) H-Score: Mengintegrasikan intensitas pewarnaan dengan proporsi sel yang diwarnai untuk evaluasi lebih detail.

e. Kontrol Positif dan Negatif

Hasil interpretasi juga harus selalu dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif untuk memastikan validitas pewarnaan dan menghindari kesalahan interpretasi akibat pewarnaan latar belakang atau artefak.

Standar interpretasi ini sangat penting terutama dalam konteks klinis seperti diagnosis kanker payudara, di mana hasil imunohistokimia digunakan untuk menentukan jenis terapi yang paling tepat. Kepatuhan terhadap standar interpretasi membantu meminimalkan bias, meningkatkan reproducibility hasil, dan mendukung pengambilan keputusan medis yang akurat.

**2. Pelatihan dan pengalaman operator dalam membaca hasil**

Pelatihan dan pengalaman operator dalam membaca hasil adalah aspek krusial di laboratorium histokimia dan imunohistokimia untuk memastikan hasil pemeriksaan yang akurat dan dapat diandalkan.

Operator, baik teknisi laboratorium maupun dokter spesialis patologi anatomik, harus memiliki keterampilan interpretasi yang baik untuk membedakan pewarnaan spesifik dari background staining, mengenali pola pewarnaan, dan menilai tingkat ekspresi antigen secara tepat. Pelatihan intensif yang mencakup teori dasar imunohistokimia, praktik langsung, dan studi kasus klinis diperlukan untuk meningkatkan pengetahuan dan kemampuan teknis.

Contohnya, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada (FK-KMK UGM) telah menyelenggarakan workshop dasar interpretasi pemeriksaan imunohistokimia bagi dokter spesialis patologi anatomik yang meliputi materi teori dan praktik serta diskusi kasus nyata. Pelatihan semacam ini memperkuat pemahaman teknis serta aplikasi klinis, meningkatkan kepercayaan diri operator dalam membaca dan melaporkan hasil imunohistokimia.

Pengalaman praktis yang konsisten juga berperan penting dalam mengasah ketajaman interpretasi, memungkinkan operator mengenali artefak, variasi biologis, dan pola pewarnaan yang kompleks dalam berbagai jenis jaringan dan penyakit.

Selain pengembangan kemampuan individu, pelatihan terstruktur dan berkala juga mendukung standar kualitas laboratorium dan keamanan pasien dengan mengurangi risiko kesalahan diagnosis akibat interpretasi yang salah.

Pelatihan dan pengalaman operator merupakan pondasi utama dalam menjamin kualitas hasil histokimia dan imunohistokimia, sekaligus meningkatkan akurasi diagnostik dan efektivitas penatalaksanaan klinis.

### **3. Dokumentasi dan Pelaporan Hasil Secara Sistematis**

Dokumentasi dan pelaporan hasil pemeriksaan adalah bagian integral dari kualitas pelayanan laboratorium histokimia dan imunohistokimia. Sistem dokumentasi yang baik memastikan data hasil pemeriksaan dapat dipertanggungjawabkan, mudah diakses, dan digunakan secara efektif dalam diagnosis serta penelitian.

Komponen utama dokumentasi meliputi:

#### **a. Identifikasi Sample**

Setiap sampel harus diberi identifikasi lengkap yang mencakup nama pasien, nomor registrasi, tanggal pengambilan dan penerimaan sampel, serta jenis dan lokasi jaringan. Ini penting untuk melacak dan menghindari salah sampel.

b. Rekaman Prosedur dan Reagen

Data lengkap mengenai protokol pewarnaan, jenis dan nomor batch reagen (terutama antibodi primer dan sekunder), waktu inkubasi, serta kondisi laboratorium dicatat untuk menjamin reproducibility dan kontrol mutu.

c. Hasil Pemindaian dan Foto Mikroskopis

Dokumentasi gambar mikroskopis hasil pewarnaan sangat bernilai baik sebagai bukti visual dan untuk evaluasi ulang. Foto harus jelas serta disertai keterangan magnifikasi, area jaringan, dan fitur penting hasil pewarnaan.

d. Interpretasi Hasil

Deskripsi hasil, termasuk intensitas dan distribusi pewarnaan, proporsi sel positif, serta pola pewarnaan, dicatat sesuai standar interpretasi yang berlaku. Penilaian ini harus dilakukan oleh operator yang kompeten dan dilengkapi dengan tanda tangan atau identifikasi pelaksana.

e. Laporan Resmi

Laporan hasil dikomunikasikan secara resmi kepada pihak pengguna (dokter, peneliti) dalam format yang sistematis dan mudah dipahami. Memuat kesimpulan diagnostik serta rekomendasi bila diperlukan, laporan juga harus mencantumkan tanggal pemeriksaan dan identitas petugas laboratorium.

f. Sistem Penyimpanan dan Keamanan Data

Data hasil pemeriksaan harus disimpan secara aman dan terorganisir dalam waktu lama sesuai regulasi atau kebutuhan penelitian. Penggunaan sistem informasi laboratorium elektronik (LIS) atau digitalisasi hasil semakin mendorong kemudahan pelacakan dan pengelolaan data.

Dokumentasi dan pelaporan sistematis ini merupakan jaminan kualitas laboratorium, memudahkan audit, kolaborasi antar profesional kesehatan, dan mendukung ketepatan diagnosis serta pengobatan pasien.

## H. Metode Kontrol Kualitas Khusus Imunohistokimia

Kontrol kualitas dalam imunohistokimia (IHC) meliputi serangkaian prosedur yang dirancang untuk memastikan keakuratan, keandalan, dan reproducibility hasil pemeriksaan imunohistokimia. Metode ini mencakup beberapa tahapan dan teknik khusus yang dikategorikan dalam fase pra-analitik, analitik, dan pasca-analitik.

### 1. Fase Pra-Analitik:

- a. Fiksasi Jaringan: Proses fiksasi yang tepat dan konsisten sangat penting untuk menjaga integritas antigen, mencegah degradasi, dan mengurangi artefak.
- b. Persiapan Slide: Termasuk deparafinasi dan antigen retrieval yang distandarisasi sebelum pewarnaan.

### 2. Fase Analitik:

- a. Validasi dan Pemilihan Antibodi: Antibodi primer dan sekunder harus divalidasi dengan kontrol jaringan positif dan negatif untuk memeriksa sensitivitas dan spesifisitas.
- b. Penggunaan Kontrol Positif dan Negatif: Kontrol positif berupa jaringan yang diketahui mengandung antigen target, kontrol negatif berupa sampel tanpa antibodi primer atau jaringan tanpa antigen target, untuk memastikan pewarnaan spesifik dan mengidentifikasi pewarnaan latar belakang.
- c. Standarisasi Protokol Pewarnaan: Termasuk optimasi waktu inkubasi, konsentrasi antibodi, dan penggunaan sistem deteksi yang konsisten.
- d. Pemantauan Mutu Reagen: Melakukan pemeriksaan rutin pada batch antibodi dan reagen lainnya untuk mendeteksi perubahan kualitas.

### 3. Fase Pasca-Analitik:

- a. Interpretasi Hasil oleh Operator Berpengalaman: Penggunaan tenaga ahli dengan pelatihan khusus untuk membedakan pewarnaan spesifik dari artefak.

- b. Dokumentasi Hasil dan Audit: Semua proses dan hasil harus didokumentasikan secara sistematis serta dilakukan audit internal dan eksternal untuk evaluasi mutu berkelanjutan.
- c. Partisipasi dalam Program Penilaian Mutu Eksternal (Proficiency Testing): Melibatkan laboratorium dalam program penilaian mutu oleh lembaga independen guna membandingkan dan memastikan standar yang digunakan sesuai.

Metode ini bertujuan mengurangi variabilitas hasil pemeriksaan yang dapat terjadi akibat kesalahan teknis, penggunaan reagen yang tidak optimal, serta interpretasi yang kurang tepat. Dengan demikian, penerapan kontrol kualitas khusus di imunohistokimia adalah kunci untuk memberikan hasil diagnosa yang akurat dan dapat dipercaya, serta mendukung keputusan klinis yang optimal.

### **1. Penggunaan Kontrol Internal dan Eksternal**

Dalam imunohistokimia, kontrol internal dan eksternal merupakan komponen penting dari program kontrol kualitas yang menjamin validitas dan keandalan hasil pemeriksaan.

#### **a. Kontrol Internal**

Kontrol internal adalah bagian dari jaringan uji itu sendiri yang secara alami mengekspresikan antigen target. Contohnya adalah sel endotel pada sampel jaringan yang diketahui mengekspresikan marker seperti CD31 atau CD34. Kontrol internal memungkinkan penilaian simultan fungsi pewarnaan pada slide yang sama dengan sampel uji, sehingga memverifikasi bahwa prosedur pewarnaan berjalan dengan baik pada setiap preparat. Keberadaan kontrol internal membantu mengidentifikasi kegagalan pewarnaan secara spesifik pada satu slide tanpa harus menunggu hasil kontrol eksternal.

b. Kontrol Eksternal

Kontrol eksternal berupa blok jaringan atau preparat yang berasal dari jaringan terpisah yang diketahui mengandung antigen yang diuji. Kontrol ini kemudian diwarnai bersamaan dengan sampel uji sebagai tolok ukur validasi batch reagen dan prosedur laboratorium secara menyeluruh. Dengan kontrol eksternal, laboratorium dapat memastikan bahwa sistem imunohistokimia bekerja konsisten dari waktu ke waktu, terutama saat ada pergantian batch reagen atau perubahan protokol. Kontrol eksternal bisa berupa slide khusus yang dibuat dan disimpan untuk keperluan kontrol kualitas.

**Perbedaan dan Keduanya Saling Melengkapi**

Kontrol internal memberikan pengawasan berkala yang spesifik pada setiap sampel yang diuji, sedangkan kontrol eksternal lebih fokus pada aspek validasi sistem dan batch reagen secara global. Penggunaan kedua kontrol ini secara bersamaan meningkatkan jaminan mutu, mengurangi risiko hasil false negatif atau false positif, dan memastikan konsistensi hasil pemeriksaan imunohistokimia yang menjadi dasar diagnosis dan terapi pasien.

**2. Pengujian reprodutifitas dan konsistensi antar batch**

Pengujian Reprodutifitas dan Konsistensi Antar Batch dalam Imunohistokimia

a. Reprodutifitas (Reproducibility)

Pengujian reprodutifitas dilakukan dengan mengulangi prosedur imunohistokimia pada jaringan yang sama atau setara dalam kondisi yang berbeda, misalnya pada hari yang berbeda, oleh operator berbeda, atau menggunakan instrumen berbeda di laboratorium yang sama. Tujuannya untuk menilai kesesuaian hasil, seperti pola pewarnaan, intensitas, dan distribusi antigen, agar tetap konsisten dan bebas dari variasi yang tidak diinginkan. Reprodutifitas yang baik menunjukkan

bahwa metode dan protokol laboratorium sudah stabil dan andal.

b. Konsistensi Antar Batch Reagen

Setiap batch antibodi primer dan reagen lain yang digunakan dalam imunohistokimia harus diuji konsistensinya terhadap batch sebelumnya. Hal ini dilakukan dengan menggunakan sampel kontrol positif yang sama dan memeriksa apakah intensitas dan pola pewarnaan yang dihasilkan konsisten. Perbedaan signifikan antar batch dapat menandai adanya perubahan kualitas reagen yang memerlukan penyesuaian protokol atau penggantian produk.

c. Penggunaan Kontrol Positif dan Negatif

Dalam pengujian reproduktifitas dan konsistensi, kontrol positif berperan sebagai acuan standar pewarnaan, sedangkan kontrol negatif memastikan tidak adanya pewarnaan non-spesifik. Penggunaan kontrol ini membantu membandingkan hasil antar batch dan ulangan.

d. Dokumentasi dan Analisis Data

Semua hasil pengujian reproducibility dan konsistensi dicatat dan dianalisis untuk menilai variabilitas dan menetapkan batas toleransi. Prosedur audit internal dan evaluasi periodik dilakukan untuk menjaga mutu pemeriksaan.

e. Standar dan Pedoman Laboratorium

Laboratorium harus memiliki SOP yang jelas terkait pengujian reproducibility dan batch control serta menerapkan standar internasional untuk manajemen mutu imunohistokimia, sehingga hasil yang diperoleh memenuhi kriteria diagnostik yang diharapkan.

### **3. Peran Teknologi dan Peralatan Laboratorium dalam Menjaga Mutu**

a. Otomasi Proses Laboratorium

Penggunaan mesin otomasi untuk pemrosesan jaringan dan pewarnaan imunohistokimia meningkatkan

konsistensi, reproducibility, dan efisiensi kerja. Otomasi mengurangi kesalahan manual (human error) dan variasi antar operator, sehingga hasil pemeriksaan lebih stabil dan dapat diandalkan.

b. Mikroskop Digital dan Imaging

Teknologi mikroskop digital dengan sistem pencitraan canggih memungkinkan visualisasi hasil pewarnaan dengan resolusi tinggi serta penyimpanan gambar secara digital. Ini mendukung interpretasi yang lebih akurat, kolaborasi jarak jauh, dan dokumentasi yang lengkap.

c. Peralatan Presisi

Peralatan seperti mikrotom otomatis untuk pemotongan irisan jaringan dengan ketebalan seragam meningkatkan standar persiapan sampel. Inkubator, timer digital, dan alat pengukur suhu memastikan kondisi reaksi pewarnaan terjaga dengan tepat.

d. Sistem Manajemen Laboratorium (LIS)

Penggunaan Laboratory Information System (LIS) membantu dalam pengelolaan data sampel, hasil pemeriksaan, dokumentasi, dan pelaporan secara sistematis. Sistem ini juga memudahkan pelacakan kontrol mutu dan audit mutu internal maupun eksternal.

e. Pengujian Mutu dan Validasi Sistem

Peralatan modern dilengkapi fitur untuk pengujian kendali mutu internal secara otomatis sehingga deteksi dini masalah teknis dapat dilakukan untuk mencegah kegagalan uji. Validasi rutin dan kalibrasi peralatan juga terintegrasi dalam sistem mutu untuk menjaga akurasi.

f. Pelatihan dan Pengembangan Operator

Teknologi yang maju disertai dengan pelatihan intensif bagi operator laboratorium agar dapat memaksimalkan penggunaan peralatan guna menghasilkan hasil analisis yang tepat.

Implementasi teknologi dan peralatan modern ini meningkatkan kualitas hasil imunohistokimia, mempercepat waktu pemeriksaan, dan mengurangi biaya operasional dengan meminimalkan pengulangan pemeriksaan akibat kesalahan teknis.

## **I. Implikasi Kontrol Kualitas terhadap Diagnostik**

### **1. Menjamin Akurasi dan Presisi Hasil Pemeriksaan**

Kontrol kualitas menjaga agar hasil pemeriksaan laboratorium memiliki tingkat akurasi (ketepatan nilai yang diukur mendekati nilai sebenarnya) dan presisi (hasil yang konsisten saat pengulangan) yang tinggi. Hal ini penting untuk memastikan bahwa data yang diperoleh dapat diandalkan dalam diagnosis dan pengobatan pasien.

### **2. Meningkatkan Kepercayaan Klinis**

Hasil laboratorium yang konsisten dan dapat dipertanggungjawabkan meningkatkan kepercayaan dokter dan tim medis terhadap hasil pemeriksaan. Dengan demikian, kontrol kualitas berkontribusi langsung pada pengambilan keputusan klinis yang tepat dan efektif.

### **3. Deteksi Dini Kesalahan dan Variabilitas**

Kontrol kualitas memungkinkan deteksi dini adanya kesalahan teknis, degradasi reagen, atau masalah prosedural yang dapat memicu kesalahan hasil. Dengan mengetahui secara cepat adanya variabilitas, laboratorium dapat melakukan koreksi sebelum hasil disampaikan ke klinisi.

### **4. Pengurangan Risiko Kesalahan Diagnostik**

Kesalahan hasil laboratorium dapat menyebabkan diagnosis yang salah, terapi yang tidak tepat, dan konsekuensi klinis serius. Implementasi kontrol kualitas ketat meminimalkan risiko tersebut sehingga mendukung keselamatan pasien.

### **5. Pemenuhan Standar dan Akreditasi**

Laboratorium yang menerapkan kontrol kualitas secara konsisten memenuhi standar nasional dan internasional (misalnya ISO 15189). Hal ini diperlukan untuk

akreditasi laboratorium, yang menunjukkan kompetensi dan kredibilitas laboratorium di mata regulator dan pengguna jasa.

#### 6. Perbaikan Berkelanjutan

Data dari kegiatan kontrol kualitas menjadi bahan evaluasi dan perbaikan berkelanjutan dalam proses laboratorium. Ini mendorong peningkatan efisiensi, efektivitas, dan mutu pelayanan laboratorium secara keseluruhan.

#### 7. Kepuasan Pasien dan Klinik

Hasil laboratorium yang valid dan tepat waktu berkontribusi terhadap kepuasan pasien dan profesional kesehatan. Ini menciptakan lingkungan kerja yang profesional dan komunikasi yang optimal antara laboratorium dan klinik.

### **Pengaruh Hasil Imunohistokimia terhadap Keputusan Terapi**

#### 1. Personalisasi Terapi Kanker

Imunohistokimia (IHK) memungkinkan identifikasi ekspresi protein spesifik seperti reseptor hormon estrogen (ER), progesteron (PR), dan HER2 pada kanker payudara. Informasi ini membantu mengkategorikan tipe tumor dan memilih terapi yang paling efektif, misalnya terapi hormon untuk pasien dengan ekspresi ER/PR positif dan terapi target HER2 untuk pasien dengan overekspresi HER2.

#### 2. Penentuan Prognosis dan Risiko

Ekspresi biomarker yang dipantau melalui IHK juga berfungsi sebagai indikator prognosis. Misalnya, kanker payudara tipe luminal dengan ER/PR positif biasanya memiliki prognosis lebih baik dibandingkan tipe triple-negatif atau HER2 positif yang lebih agresif. Data ini mendukung dokter dalam merancang strategi pengobatan yang sesuai dengan risiko pasien.

#### 3. Pengarahan Terapi Target Spesifik

Pada tumor non-payudara seperti Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST), IHK untuk penanda seperti KIT (CD117) dan DOG-1 menjadi dasar untuk terapi dengan

inhibitor tirosin kinase seperti imatinib. Dengan demikian, IHK berperan langsung dalam menentukan jenis obat target yang digunakan.

4. Evaluasi Respons dan Pemantauan Terapi

IHK juga dipakai setelah terapi untuk memantau perubahan ekspresi antigen dan efektivitas pengobatan, memungkinkan penyesuaian terapi yang lebih tepat ketika terjadi resistensi atau perubahan karakter tumor.

5. Mengurangi Efek Samping dan Biaya Terapi

Dengan pendekatan terapi yang tepat sasaran berdasar IHK, terapi yang tidak diperlukan dapat dihindari, sehingga mengurangi efek samping obat dan menekan biaya pengobatan.

6. Dasar Pengembangan Terapi Baru

Penelitian berbasis IHK membantu mengidentifikasi biomarker baru yang dapat menjadi target pengembangan obat inovatif dan strategi terapeutik baru.

**Contoh Kasus Kegagalan Kontrol Kualitas dan Akibatnya**

1. Kesalahan Identifikasi dan Labeling Sampel

Kesalahan dalam identifikasi atau pelabelan spesimen pasien dapat menyebabkan laporan hasil pemeriksaan yang salah diberikan ke pasien yang berbeda. Hal ini dapat berdampak fatal pada diagnosis dan pengobatan, misalnya pasien mendapat terapi yang tidak sesuai karena hasil laboratorium bukan untuk dirinya.

2. Spesimen yang Tidak Layak atau Kurang Fiksasi

Spesimen yang diterima lab dengan kualitas buruk, misalnya fiksasi yang tidak benar atau sampel terkontaminasi, dapat menghasilkan preparat yang sulit dianalisis. Hal ini sering menimbulkan hasil negatif palsu atau tidak jelas yang memaksa pengambilan biopsi ulang dan keterlambatan diagnosis.

3. Kegagalan Dalam Pemeliharaan Reagen dan Alat

Penggunaan reagen yang sudah kadaluarsa atau penyimpanan yang buruk serta alat laboratorium yang tidak terkalibrasi dapat menyebabkan hasil pewarnaan

imunohistokimia tidak optimal. Contoh, pewarnaan yang terlalu lemah atau latar belakang yang tinggi sehingga hasilnya menyesatkan atau tidak dapat diinterpretasi.

4. Variasi Antar Batch Reagen yang Tidak Diketahui

Jika batch antibodi primer atau reagen lain berganti tanpa pengujian ulang yang tepat, hasil pewarnaan bisa berubah signifikan. Ini dapat menyebabkan inkonsistensi diagnosis dan kesalahan klasifikasi tipe tumor, yang pada akhirnya berdampak pada pilihan terapi pasien.

5. Kasus Klinis

Sebuah studi melaporkan pasien kanker dengan hasil imunohistokimia yang salah interpretasi karena kontrol kualitas tidak memadai, sehingga pasien menerima terapi hormon padahal sebenarnya tumor negatif hormon. Hal ini memperburuk kondisi pasien dan memperlambat penanganan yang tepat.

Akibat kegagalan kontrol kualitas tersebut antara lain:

1. Diagnosis yang salah atau terlambat
2. Terapi yang tidak sesuai berpotensi menyebabkan efek samping serius atau kegagalan pengobatan
3. Membutuhkan pemeriksaan ulang yang menambah biaya dan waktu
4. Menurunkan kepercayaan pasien dan profesional medis terhadap layanan laboratorium
5. Dampak buruk pada prognosis dan kualitas hidup pasien

Kontrol kualitas yang ketat dan berkelanjutan sangat krusial dalam menjaga keandalan hasil laboratorium, terutama pada pemeriksaan imunohistokimia yang berperan besar dalam diagnosis dan terapi kanker.

## J. Kesimpulan

### **Pentingnya Penerapan Kontrol Kualitas Ketat dalam Histokimia dan Imunohistokimia**

1. Menjamin Akurasi dan Validitas Hasil

Kontrol kualitas yang ketat memastikan bahwa setiap langkah proses dari fiksasi jaringan, pewarnaan, hingga

interpretasi berjalan sesuai standar. Dengan demikian, hasil yang diperoleh akurat dalam mendeteksi antigen target dan meminimalkan kesalahan teknis serta hasil palsu.

2. Mencegah Kesalahan Diagnostik

Histokimia dan imunohistokimia sering digunakan untuk diagnosa penyakit kompleks, khususnya kanker. Kontrol kualitas ketat membantu menghindari hasil negatif palsu atau positif palsu yang berpotensi menyebabkan diagnosa salah, sehingga pasien mendapat terapi yang tepat dan efektif.

3. Menjaga Konsistensi dan Reproducibility

Penggunaan kontrol mutu secara konsisten memastikan hasil uji dapat direplikasi dalam pengujian ulang atau oleh laboratorium lain. Ini penting untuk konsistensi diagnosis dan pengelolaan pasien.

4. Memenuhi Standar Regulasi dan Akreditasi

Penerapan kontrol kualitas memenuhi persyaratan regulasi nasional maupun internasional, serta mendukung akreditasi laboratorium yang menggaransi standar pelayanan profesional dan kredibel.

5. Meningkatkan Kepercayaan Klinis dan Pasien

Hasil penelitian dan diagnosis dari laboratorium yang menerapkan kontrol kualitas ketat lebih dipercaya oleh dokter dan pasien, sehingga mempermudah pengambilan keputusan terapi dan meningkatkan kepuasan pasien.

6. Mendukung Pengembangan Terapi yang Tepat

Dengan hasil yang tepat dan terpercaya, imunohistokimia membantu menentukan terapi target, pilihan pengobatan, dan memantau respons terapi secara optimal, yang sangat berguna dalam pengobatan kanker dan penyakit lain.

7. Peningkatan Profesionalisme Laboratorium

Penerapan kontrol kualitas yang ketat mendorong staff laboratorium untuk berkompeten dan mengikuti praktik terbaik, serta melakukan pelatihan dan evaluasi berkala.

## **Rekomendasi Praktik Terbaik dalam Histokimia dan Imunohistokimia**

### **1. Fiksasi dan Pemrosesan Sampel Optimal**

Segera setelah pengambilan, jaringan harus difiksasi dengan fiksatif yang sesuai (misalnya formalin buffered 10%) dalam waktu yang cukup dan suhu yang terkontrol untuk menjaga integritas antigen dan struktur jaringan. Proses pemrosesan jaringan (dehidrasi, embedding) harus dilakukan secara standar dan konsisten.

### **2. Standarisasi dan Validasi Protokol**

Laboratorium harus memiliki protokol pewarnaan yang terdokumentasi dengan jelas, termasuk penggunaan klon antibodi primer yang tervalidasi, konsentrasi antibodi, durasi dan suhu inkubasi, serta teknik antigen retrieval yang optimal. Protokol harus diuji dan divalidasi secara berkala.

### **3. Penggunaan Kontrol Positif dan Negatif**

Setiap batch pewarnaan harus disertai kontrol jaringan positif (dengan antigen yang diketahui ada) dan negatif (tanpa antibodi primer) untuk memastikan pewarnaan spesifik dan mendeteksi pewarnaan latar belakang atau artefak.

### **4. Pelatihan dan Kompetensi Personil**

Operator dan ahli patologi harus mendapat pelatihan berkelanjutan dalam teknik dan interpretasi imunohistokimia untuk meminimalkan kesalahan teknis dan interpretasi.

### **5. Automasi dan Teknologi Modern**

Penggunaan alat otomatisasi pewarnaan dan digital imaging meningkatkan konsistensi dan kualitas hasil serta memudahkan dokumentasi dan review.

### **6. Kontrol Kualitas Internal dan Eksternal**

Laboratorium harus menerapkan program kontrol kualitas internal serta berpartisipasi dalam program penilaian mutu eksternal (proficiency testing) untuk memonitor dan mempertahankan mutu hasil pemeriksaan.

7. Dokumentasi dan Pelaporan yang Sistematis  
Semua langkah kerja, hasil pemeriksaan, dan interpretasi harus didokumentasikan secara rinci dalam laporan yang mudah dipahami oleh tim klinis.
8. Evaluasi dan Peningkatan Mutu Berkelanjutan  
Laboratorium harus rutin melakukan audit mutu, evaluasi performa reagen dan protokol, serta update metode sesuai perkembangan ilmu dan teknologi.

### **Prospek Pengembangan Teknologi Kontrol Mutu Ke Depan**

1. Otomasi dan Integrasi Sistem  
Perkembangan pesat otomasi laboratorium memungkinkan proses kontrol mutu berjalan lebih efisien dan konsisten. Sistem otomasi yang terintegrasi dengan Laboratory Information System (LIS) memudahkan monitoring real-time, pelacakan data kontrol mutu, dan deteksi anomali secara cepat.
2. Penggunaan Kecerdasan Buatan (Artificial Intelligence/AI)  
Teknologi AI dan machine learning mulai diterapkan untuk analisis citra histologi dan imunohistokimia, termasuk deteksi pewarnaan yang abnormal dan evaluasi hasil secara objektif. AI dapat meningkatkan reproducibility dan mengurangi subjektivitas interpretasi manual dari operator.
3. Pengembangan Bahan Kontrol Standard dan Pooled  
SeraInovasi pada bahan kontrol mutu, seperti penggunaan pooled sera yang lebih ekonomis dan stabil, memungkinkan kontrol kontinu tanpa mengorbankan kualitas. Secara ilmiah, bahan kontrol ini diuji untuk memastikan reliabilitas yang setara dengan kontrol komersial.
4. Teknologi Biomolekuler Baru  
Pengintegrasian teknik biomolekuler canggih, seperti digital PCR dan sequencing, dalam kontrol mutu laboratorium memungkinkan validasi antigen dan deteksi mutasi spesifik dengan tingkat sensitivitas tinggi.

5. Sistem Validasi Otomatis dan Feedbac

Sistem validasi hasil otomatis dan feedback loop terintegrasi memungkinkan perbaikan proses secara cepat dan kontinu. Ini mendukung pendekatan prediktif dalam pengendalian mutu yang berpusat pada pencegahan kesalahan daripada koreksi pasca-fakta.

6. Pelatihan Virtual dan Simulasi

Teknologi pembelajaran virtual dan simulasi interaktif akan mengembangkan kemampuan tenaga laboratorium dalam kontrol mutu tanpa risiko langsung pada sampel nyata, mempercepat peningkatan kompetensi.

7. Standarisasi dan Akreditasi Global yang Lebih Ketat

Pengembangan standar mutu global yang semakin ketat dan penggunaan teknologi monitoring jarak jauh akan mendorong laboratorium mengikuti praktik terbaik dunia.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ara JARA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. 2005;426:405–26.
- Bzorek M. Perspectives From the NordiQC Proficiency Testing Program. 2023;31(7):452–8.
- C. Bordea, A. Blidaru, I. Condrea AP. Clinical e pathological findings of sentinel lymph node invasion in breast cancer. In 2014. p. 2014.
- Can W, Wrong G. Diagnostic Immunohistochemistry. 2016;140(September).
- Guo H, Diao L, Zhou X, Chen J neng, Zhou Y, Fang Q, et al. Artificial intelligence based analysis for immunohistochemistry staining of immune checkpoints to predict resected non-small cell lung cancer survival and relapse. 2021;10(6):2452–74.
- Hawes D, David S rong SHI, Taylor CR, Cote RJ. Immunohistochemistry. 2020;(January).
- Hewitt SM, Baskin DG, Frevert CW, Stahl WL, Rosa-Molinar E. Controls for Immunohistochemistry: The Histochemical Society’s Standards of Practice for Validation of Immunohistochemical Assays. J Histochem Cytochem. 2014;62(10):693–7.
- Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. In: microscopy. 2013. p. 1–26.
- Idikio HA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle , use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. 2010;3(2):169–76.
- Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. 2018;

- Kalra L. Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Tissues: An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections. 1991;
- Kayser K, Görtler J, Bogovac M, Bogovac A, Goldmann T, Vollmer E, et al. AI (artificial intelligence) in histopathology--from image analysis to automated diagnosis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009 Jan;47(3):355–61.
- Kayser K, Görtler J, Bogovac M, Bogovac A. AI ( artificial intelligence ) in histopathology – from image analysis to automated diagnosis. 2009;(January).
- Libard S, Cerjan D, Alafuzoff I. Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2019;151(1):91–6.
- Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An introduction to the performance of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology.* 2019. p. 289–98.
- Matos LL De, Trufelli DC, Graciela M, Matos L De. Biomarker Insights Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. :9–20.
- Pang J min B, Byrne DJ, Bergin ART, Caramia F, Loi S, Gorringer KL, et al. Spatial transcriptomics and the anatomical pathologist : Molecular meets morphology. 2024;577–86.
- Pavone AM, Giannone AG, Cabibi D, Aprile SD, Denaro S, Salvaggio G, et al. Digital Pathology : A Comprehensive Review of Open-Source Histological Segmentation Software. 2024;173–96.
- Polak JM VNS. Introduction to Immunocytochemistry 3rd ed. oxford, editor. UK: Scientific Publishers Ltd; 2003.
- Ramos A. Chapter 5 Principles and Methods of Immunohistochemistry. 691:83–96.

- Rana MK, Rana APS, Jain A, Pathak A, Sr UK. Standardization of Manual Method of Immunohistochemical Staining for Breast Cancer Biomarkers at Tertiary Cancer Care Center : An Audit. 2022;14(6):8-13.
- Salas AA, Hernández SAÉM, Aquiles H, Martínez M, Vilchis JGC, Alejandra L, et al. Reproducibility of the EGFR immunohistochemistry scores for tumor samples from patients with advanced nonsmall cell lung cancer. 2017;912-20.
- Seijen M Van, Brcic L, Gonzales AN, Sansano I, Bendek M, Brcic I. Impact of delayed and prolonged fixation on the evaluation of immunohistochemical staining on lung carcinoma resection specimen. 2019;191-9.
- Shams F, Golchin A, Azari A, Mohammadi L, Fateme A, Atiyeh Z. Nanotechnology-based products for cancer immunotherapy. Mol Biol Rep [Internet]. 2022;49(2):1389-412.
- Shi S rong, Imam SA, Young L, Cote RJ, Clive RLR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry Under the Influence of pH Using Monoclonal Antibodies '. 1994;43(2):193-201.
- Shi S rong, Shi Y, Taylor CR. Antigen Retrieval Immunohistochemistry : Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades. 2011;
- Shojaeian, S., Maslehat Lay, N., & Zarnani AH. Detection Systems in Immunohistochemistry [Internet]. IntechOpen.
- Sloan P, Moratin J, Mock A, Obradovic S, Metzger K. Digital Pathology Scoring of Immunohistochemical Staining Reliably Identifies Prognostic Markers and Anatomical Associations in a Large Cohort of Oral Cancers. 2021;11(July):1-11.
- Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. Cancer Commun (London, England). 2020 Apr;40(4):135-53.

- True LD. Quality control in molecular immunohistochemistry. 2008;473–80. 29. Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. 2014;1–12.
- Tsutsumi Y. Pitfalls and Caveats in Applying Chromogenic Immunostaining to Histopathological Diagnosis. 2021;1–57.
- Vancurova I, Zhu Y. Immune Mediators in Cancer. UK: Humana Press; 2020. 152 p.
- Yu Q, Jiang M, Wu L. Spatial transcriptomics technology in cancer research. 2022;(October):1–18.

# BAB 15

## TINDAKAN PENCEGAHAN KESELAMATAN KERJA DI LABORATORIUM HISTOKIMIA DAN IMUNOHISTOKIMIA

A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.

### A. Pendahuluan

Laboratorium histokimia dan imunohistokimia memainkan peran penting dalam diagnosis patologis, penelitian biomedis, dan pengembangan terapi. Proses kerja di laboratorium tersebut melibatkan serangkaian tahapan teknis – mulai dari penanganan spesimen biologis, fiksasi jaringan, pemrosesan parafin, hingga pewarnaan imunologis – yang dapat menimbulkan risiko keselamatan kerja baik dari aspek biologis maupun kimiawi. Oleh karena itu, penerapan langkah-langkah pencegahan dan pengendalian risiko yang sistematis mutlak diperlukan untuk melindungi tenaga laboratorium, menjaga kualitas hasil pemeriksaan, dan memenuhi standar keselamatan laboratorium modern (Kim, et al., 2016).

Beberapa bahaya yang sering dijumpai pada laboratorium histokimia/imunohistokimia meliputi: (1) eksposur bahan kimia berbahaya seperti formaldehida/formalin, xylene, etanol, dan reagen antigen-retrieval; (2) paparan ke materi biologis yang dapat mengandung patogen; serta (3) bahaya fisik seperti tumpahan, pecah gelas, dan paparan radiasi dari instrumen tertentu. Formaldehida khususnya diakui sebagai iritan pernapasan dan bahan yang memiliki potensi karsinogenik sehingga memerlukan kontrol eksposur yang ketat sesuai pedoman keselamatan kerja (NIOSH/CDC, 2019).

Prinsip manajemen risiko pada laboratorium ini harus berbasis **penilaian risiko (risk assessment)** yang komprehensif dan penerapan hirarki pengendalian: (1) eliminasi atau substitusi bahan berbahaya bila memungkinkan (mis. alternatif fiksatif atau proses bebas-xylene), (2) kontrol rekayasa (mis. ventilasi lokal, lemari hisap, sistem pengolahan limbah), (3) kontrol administratif (SOP tertulis, pelatihan, rotasi tugas), dan (4) penggunaan alat pelindung diri (APD) yang sesuai. Rekomendasi dan standar internasional seperti WHO *Laboratory Biosafety Manual* menekankan pentingnya pendekatan berlapis ini serta dokumentasi SOP dan pelatihan berkelanjutan untuk memastikan keselamatan operasional (WHO, 2020).

Implementasi langkah-langkah pencegahan yang konsisten—termasuk penyusunan *Chemical Hygiene Plan*, pemantauan udara bila perlu, fasilitas pencuci mata/deluge shower, pengelolaan limbah kimia dan biologis yang terstandar, serta penyediaan *Safety Data Sheets* (SDS) untuk semua reagen—tidak hanya mengurangi insiden kecelakaan kerja tetapi juga meningkatkan akurasi dan *reproducibility* hasil histokimia/imunohistokimia. Oleh karena itu, pedoman teknis akhir yang memuat SOP operasional, daftar pemeriksaan keselamatan, serta skema pelatihan dan audit internal harus menjadi bagian terintegrasi dari manajemen laboratorium (OSHA, 1910).

## **B. Pengenalan Risiko di Laboratorium Histokimia dan Imunohistokimia**

Laboratorium histokimia dan imunohistokimia memang menghadirkan tantangan keselamatan kerja yang serius karena penggunaan berbagai bahan kimia berbahaya. *Formaldehida*, asam kuat, dan pelarut organik seperti *xylene* sering digunakan dalam proses fiksasi, pewarnaan, clearing, dan de-parafinisasi jaringan. Formaldehida, misalnya, dikenal sebagai karsinogen dan dapat menyebabkan iritasi saluran pernapasan, mata, dan kulit, terutama bila ventilasi dan proteksi pernapasan tidak memadai (OSHA, 1910).

*Xylene* juga berpotensi menimbulkan efek toksik akut dan kronik. Paparan jangka pendek terhadap uap *xylene* dapat menyebabkan sakit kepala, pusing, mual, dan iritasi pada mata dan saluran pernapasan. Bila paparan terus-menerus, dapat berdampak pada sistem saraf pusat, hati, dan ginjal (Kandyala, et al., 2010).

Selain itu, penggunaan asam kuat (misalnya dalam antigen retrieval atau deparafinasi) juga bisa menyebabkan bahaya seperti luka bakar, kerusakan jaringan, dan korosi peralatan. Kombinasi prosedur fisik (panas, tekanan) dengan asam kuat dan formaldehida bisa memperparah risiko, misalnya meningkatkan volatilitas formaldehida atau memecah pelarut menjadi zat yang lebih berbahaya (NIOSH/CDC, 2019).

Oleh karena itu, penting untuk menerapkan langkah-pengendalian: penggunaan lemari asam / *hoods*, ventilasi adekuat, pelindung pribadi (sarung tangan, pelindung mata, jas lab), monitoring konsentrasi bahan kimia (*formaldehida*, *xylene*) di udara, pelatihan reguler bagi personel laboratorium, serta mempertimbangkan alternatif bahan kimia yang lebih aman bila memungkinkan (Kim, et al., 2016).

### C. Pengelolaan Risiko dan Keselamatan Kerja (K3) di Laboratorium

Pengelolaan risiko yang komprehensif merupakan fondasi utama dari sebuah program K3 laboratorium yang efektif dan berkelanjutan. Proses ini diawali dengan **identifikasi bahaya** – semua agen bahaya kimia, fisik, biologis, dan ergonomis yang digunakan di laboratorium harus diinventarisasi (misalnya formaldehida, *xylene*, asam kuat, panas, radiasi, potensi luka mekanis). Setelah identifikasi, dilanjutkan dengan **penilaian risiko**, yaitu mengevaluasi seberapa besar probabilitas serta seberapa parah konsekuensi apabila bahaya itu terekspos ke personel laboratorium. Penilaian ini juga mempertimbangkan seberapa sering penggunaan bahan/peralatan, durasi paparan, rute paparan (inhalasi, kontak kulit, tertelan), dan ada tidaknya efek kumulatif. (National

Research Council (US) Committee on Prudent Practices in the Laboratory, 2011).

Selanjutnya, perlu **penetapan kontrol** yang tepat agar risiko dapat dikurangi ke tingkat yang dapat diterima. Kontrol ini meliputi kontrol teknis (engineering controls) seperti sistem ventilasi, lemari asam (fume hoods), pemilihan ruang kerja yang aman, kontrol administratif (prosedur kerja baku / SOP, rotasi kerja, pelabelan, pemberitahuan bahaya), dan penggunaan alat pelindung diri (PPE) yang sesuai (Wang, et al., 2025).

Penunjukan petugas keselamatan laboratorium (Laboratory Safety Officer, LSO) yang kompeten adalah sangat penting. LSO ini harus memiliki latar belakang pelatihan K3 yang memadai serta pengalaman dalam laboratorium agar mampu mengawasi semua aspek keselamatan – mulai dari pengawasan identifikasi bahaya, verifikasi bahwa penilaian risiko dilakukan dengan cermat, hingga memastikan bahwa kontrol yang disiapkan bekerja sesuai standar. LSO juga bertugas memastikan dokumentasi yang memadai seperti MSDS/label bahan kimia, catatan inspeksi, dan laporan insiden (Wang, et al., 2025).

Pelatihan berkala bagi staf laboratorium juga tidak boleh diabaikan. Pelatihan ini idealnya mencakup: pemahaman tentang bahaya bahan kimia dan fisik, prosedur kerja aman, penggunaan dan pemeliharaan APD (termasuk respirator kalau dibutuhkan), juga tindakan darurat seperti tanggap tumpahan bahan kimia, kebakaran, evakuasi. Penelitian menunjukkan bahwa kepatuhan terhadap prosedur keselamatan dan penggunaan PPE meningkat jika pelatihan dilakukan secara rutin, simultan dengan penguatan budaya keselamatan laboratorium (safety culture) dan adanya supervisi yang konsisten (Schröder, et al., 2016).

#### **D. Pencegahan Cedera akibat Bahan Kimia Berbahaya**

Penanganan bahan kimia berbahaya memerlukan kewaspadaan tinggi dan kepatuhan terhadap prosedur standar operasi (SOP) yang telah ditetapkan. Salah satu elemen kunci

dari sistem pengendalian rekayasa di laboratorium adalah penggunaan **lemari asam (fume hood)**. Lemari asam berfungsi untuk mengendalikan paparan uap, gas, dan partikel berbahaya dengan menarik udara menjauh dari pengguna dan mengeluarkannya melalui sistem ventilasi yang sesuai. Oleh karena itu, semua kegiatan yang melibatkan bahan kimia volatil, karsinogenik, atau toksik, seperti formaldehida, xylene, atau asam kuat, wajib dilakukan di dalam lemari asam yang telah **bersertifikat dan diuji kinerjanya secara rutin**. Pengujian aliran udara dan sertifikasi biasanya dilakukan setidaknya setahun sekali, sesuai pedoman OSHA dan NIOSH, guna memastikan laju aliran minimal 80-120 fpm (feet per minute) tetap terjaga (NIOSH, 2003; OSHA, 2011).

Selain itu, pengguna harus dilatih untuk mengoperasikan lemari asam dengan benar, termasuk menjaga posisi wajah dan tubuh di luar area kerja lemari, tidak menumpuk peralatan yang menghalangi aliran udara, serta selalu menurunkan sash (kaca pelindung) ke ketinggian yang dianjurkan. Kegagalan mematuhi aturan ini dapat berakibat fatal. Misalnya, sebuah insiden nyata dilaporkan di mana seorang mahasiswa mengalami **iritasi mata serius setelah membuka wajahnya di atas larutan paraformaldehida panas di luar lemari asam**. Kasus tersebut menunjukkan bahwa paparan uap formaldehida yang dilepaskan ke udara bebas dapat segera menyebabkan kerusakan mukosa dan jaringan mata, bahkan pada paparan singkat (Fustinoni., et al., 2021). Insiden ini menekankan pentingnya tidak hanya memiliki lemari asam yang berfungsi baik, tetapi juga menegakkan budaya keselamatan dan kepatuhan yang konsisten di lingkungan laboratorium.

#### **E. Pencegahan Cedera Mekanis dan Luka Tusuk**

Cedera mekanis dan luka tusuk (sharps injury) merupakan salah satu risiko pekerjaan serius di laboratorium dan fasilitas layanan kesehatan, terutama ketika menangani alat tajam seperti jarum suntik, pisau bedah, jarum biopsi, serta pecahan gelas. Kontak tidak sengaja terhadap benda tajam yang

terkontaminasi dapat menyebabkan paparan langsung ke bahan biologis – seperti darah atau cairan jaringan – yang mengandung patogen berbahaya seperti hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV), maupun HIV. Oleh karena itu, tindakan pencegahan harus bersifat sistematis dan menyeluruh, dengan memadukan elemen rekayasa (engineering controls), praktek kerja aman (work practice controls), dan penggunaan alat pelindung diri (APD) sebagai lapisan pengaman akhir.

Secara teknis, langkah pengendalian rekayasa yang efektif mencakup penggunaan alat tajam dengan fitur keamanan (safety-engineered devices) yang memiliki mekanisme perlindungan otomatis setelah penggunaan – misalnya jarum yang memiliki pelindung otomatis atau pelindung yang bisa ditarik – yang telah terbukti secara ilmiah mampu mengurangi kejadian luka tusuk secara signifikan (Rogues, et al., 2004). Selain itu, penggunaan zona netral (neutral zone) dan teknik bebas-tangan (hands-free technique) – yaitu saat penyampaian atau penerimaan alat tajam antar personel dilakukan tanpa kontak langsung tangan ke tangan – sangat dianjurkan agar meminimalisasi risiko tertusuk saat passing instrumen antar tim (R, et al., 2010).

Dalam aspek praktik kerja aman (work practice controls), penting untuk merancang proses penggunaan alat tajam sedemikian rupa agar tidak memerlukan manipulasi ulang (recapping), melipat (bending), atau membongkar (manipulation) secara manual setelah digunakan. (NIOSH/CDC, 2019). Prosedur pengumpulan dan pembuangan alat tajam harus dilakukan segera setelah selesai digunakan ke dalam wadah tahan tusuk yang berlabel dan memiliki penutup tertutup rapat (puncture-resistant sharps container) (Carli, et al., 2014). Selain itu, pengaturan ruang kerja yang rapi dan terorganisasi – seperti tray instrumen yang teratur, jalur aliran kerja yang jelas, dan tidak menempatkan benda tajam melewati batas keselamatan – dapat mengurangi terjadinya benturan atau kecelakaan tidak sengaja (Nkosi, et al., 2025).

Sedangkan dalam penggunaan APD, petugas laboratorium harus memakai sarung tangan tahan tusuk (cut-resistant or puncture-resistant gloves) meskipun sarung tangan saja tidak mencegah penetrasi alat tajam, tetapi dapat mengurangi langsung kontak dengan permukaan kulit (LabManager, 2025). Dalam situasi penggunaan alat tajam di laboratorium kimia, ada tambahan bahaya paparan zat kimia jika tusukan terjadi. Oleh sebab itu, selain sarung tangan, pakaian pelindung, pelindung wajah (face shield), dan kacamata pelindung juga perlu digunakan sesuai risiko prosedur (Kim, et al., 2016)

Lebih lanjut, budaya keselamatan (safety culture) sangat krusial – petugas harus dilatih secara rutin, didorong untuk melaporkan insiden atau hampir celaka (near-miss), dan dilakukan audit internal untuk mengevaluasi pelaksanaan kebijakan pencegahan (Susan Q. Wilburn, 2004). Dengan pendekatan integratif seperti ini, risiko cedera mekanis dan luka tusuk dapat ditekan secara signifikan, melindungi kesehatan personel laboratorium dan menjaga kesinambungan operasional institusi.

#### **F. Protokol Penanganan dan Pembuangan Limbah Berbahaya**

Penanganan dan pembuangan limbah berbahaya di laboratorium harus mengikuti prosedur yang ketat dan sistematis agar tidak membahayakan manusia maupun lingkungan. Limbah berbahaya mencakup zat kimia korosif, mudah terbakar, reaktif, toksik, serta bahan biologis yang belum dinetralisasi atau diinaktifkan. Protokol umum diawali dengan **segregasi limbah** di tempat asal penggunaannya (point of generation), di mana jenis limbah kimia, biologis, limbah padat dan cair dipisahkan sesuai karakteristiknya. Setiap wadah limbah harus kompatibel dengan zat yang ditampung, ditutup rapat kecuali saat penambahan limbah, dan dilengkapi label yang memuat nama lengkap zat, tanggal akumulasi, konsentrasi, dan simbol bahaya yang tepat (National Research

Council (US) Committee on Prudent Practices in the Laboratory, 2011).

Limbah kimia padat dan cair tidak boleh dibuang langsung ke saluran pembuangan atau tempat sampah umum kecuali secara eksplisit diizinkan oleh regulasi setempat setelah dinetralisasi atau dilunakkan. Bila terjadi limbah cair biologis atau campuran kimia-biologi, limbah tersebut sebaiknya diinaktivasi terlebih dahulu (misalnya dengan larutan desinfektan seperti natrium hipoklorit) selama waktu kontak yang sesuai sebelum dibuang atau dikumpulkan sebagai limbah kimia. Untuk limbah tajam (seperti jarum, pisau, pecahan kaca), wajib menggunakan wadah tahan tusuk (puncture-resistant sharps container) yang tertutup dan berlabel khusus sesuai prosedur biosafety (NIOSH/CDC, 2019).

Selain itu, laboratorium perlu menyusun *Satellite Accumulation Area (SAA)*—area sementara di dalam laboratorium dekat titik pembangkitan limbah—untuk menampung limbah berbahaya dalam batas volume tertentu sebelum diangkut ke tempat penyimpanan pusat. Limbah yang telah penuh atau mencapai batas akumulasi harus segera dijadwalkan pengambilan oleh unit pengelola limbah institusi dalam waktu yang diizinkan (misalnya dalam 90 hari) agar tidak terjadi penumpukan atau kebocoran. Pengelola laboratorium juga perlu melakukan inspeksi rutin terhadap wadah penyimpanan limbah—memastikan tidak ada kebocoran, korosi, atau kerusakan kemasan—dan mencatat tiap proses pembuangan dalam dokumentasi formal (Nkosi, et al., 2025).

Untuk limbah berbahaya lintas negara atau yang memerlukan pengolahan khusus, pengelolaan harus mengikuti regulasi lokal maupun standar internasional seperti konvensi Basel tentang pengendalian lintas batas limbah berbahaya dan konvensi lingkungan terkait. Dengan menerapkan protokol tersebut secara konsisten—segregasi, pelabelan, inaktivasi, wadah khusus, akumulasi terkontrol, pengambilan terjadwal, inspeksi dan dokumentasi—laboratorium dapat meminimalkan

risiko bagi petugas, masyarakat, dan lingkungan dalam jangka panjang.

### G. Pencegahan Paparan Infeksi dan Penyakit Menular

Dalam konteks laboratorium, pencegahan paparan infeksi dan penyakit menular merupakan aspek sangat krusial mengingat pekerja laboratorium sering bersentuhan secara langsung atau tidak langsung dengan spesimen biologis (darah, cairan tubuh, jaringan, atau kultur mikroorganisme). Risiko paparan ini dapat terjadi melalui rute inhalasi (aerosol), inokulasi (tertusuk benda tajam), kontak kulit dan selaput lendir, atau bahkan kontaminasi silang antar sampel. Oleh karena itu, penerapan prinsip **Biosekuriti / Biosafety** menjadi keharusan, termasuk klasifikasi laboratorium berdasarkan tingkat risiko (BSL-1 hingga BSL-4) dan penerapan level keamanan sesuai agen patogen yang ditangani (Schröder, et al., 2016).

Langkah utama dalam pencegahan meliputi (Wang, et al., 2025): (1) **melakukan penilaian risiko (risk assessment)** terhadap setiap prosedur laboratorium, menentukan potensi paparan dan tingkat biosafety yang diperlukan; (2) **menerapkan praktik kerja aseptik dan teknik biologis yang aman** – misalnya penggunaan pipet otomatis (hindari pipet hisap mulut), pembukaan tabung/tutup di atas kabinet aliran laminar atau biosafety cabinet, dan penggunaan teknik pipet membagi aliran (aliquoting) dengan memperhatikan risiko aerosol; (3) **penggunaan alat pelindung diri (APD) yang sesuai**, termasuk jas laboratorium, sarung tangan ganda jika perlu, masker partikulat atau respirator (jika prosedur memunculkan aerosol), serta pelindung wajah (*face shield*) dan kacamata keselamatan untuk melindungi mata dan mukosa dari percikan.

Selanjutnya, **kontrol rekayasa** sangat penting, seperti penggunaan kabinet biosafety (class II atau lebih tinggi) saat menangani mikroorganisme, sistem ventilasi laboratorium dengan perbedaan tekanan udara (*negative pressure*), dan HEPA filter untuk udara buangan. Waste decontamination (misalnya sterilisasi dengan autoklaf atau penggunaan disinfektan efektif)

juga harus diterapkan secara ketat pada limbah biologis sebelum pembuangan (Carli, et al., 2014).

Selain itu, manajemen **kultur dan stok mikroorganisme secara terkendali**, pencatatan inventaris, serta pembatasan akses ke ruang laboratorium patogenik harus dijalankan. Petugas wajib dilatih rutin tentang tata laksana darurat (spill response, exposure incident) dan dilengkapi prosedur tertulis (SOP, protokol darurat). Pelaporan dan tindak lanjut terhadap insiden paparan (exposure) harus segera dilakukan, termasuk evaluasi medis, profilaksis jika tersedia, dan pencatatan kejadian sebagai bagian dari budaya keselamatan laboratorium (*safety culture*) (Nkosi, et al., 2025).

## DAFTAR PUSTAKA

- Carli, G. D., Abiteboul, D. & Puro, V., 2014. The importance of implementing safe sharps practices in the laboratory setting in Europe. *Biochem Med (Zagreb)*, 24(1), pp. 45-56.
- Fustinoni, S., L., C. & A., S. F. C. L. C. A. S., 2021. Exposure and Management of the Health Risk for the Use of Formaldehyde and Xylene in a Large Pathology Laboratory.. *Annals of Work Exposures and Health*, 65(7), pp. 805-808.
- Kim, S.-W., Roh, J. & Park, C.-S., 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*, 50(6), pp. 411-418.
- National Research Council (US) Committee on Prudent Practices in the Laboratory, 2011. *Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards: Updated Version*. Washington (DC): National Academies Press.
- NIOSH/CDC, 2019. *Formaldehyde*, Cincinnati, OH: s.n.
- Nkosi, C. S. et al., 2025. Preventive strategies for needle stick incidents during surgical procedures: a narrative review to guide healthcare professionals. *Journal Orthopedic Reports*, pp. 1-6.
- OSHA, 1910. *ormaldehyde standard; dan Laboratory Safety Guidance*, s.l.: s.n.
- R, K., SP, R. & ST, R., 2010. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofac Pathol*, 14(1), pp. 1-5.
- Rogues, A.-M. et al., 2004. Impact of safety devices for preventing percutaneous injuries related to phlebotomy procedures in health care workers. *American Journal of Infection Control*, 32(8), pp. 441-444.
- Schröder, I. et al., 2016. Laboratory safety attitudes and practices: A comparison of academic, government, and industry researchers. *J. Chem. Health Saf.*, 23(1), pp. 12-23.

- Susan Q. Wilburn, M. R., 2004. Needlestick and Sharps Injury Prevention. *The Online Journal of Issues in Nursing*.
- SW, K., J, R. & CS., P., 2016. Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J Pathol Transl Med*, pp. 411-418.
- Wang, W., Su, Y., Cao, H. & Li, D., 2025. Enhancing Chemical Laboratory Safety with Hazards Risks Mitigation and Strategic Actions. *Laboratories*, 2(1), p. 5.
- WHO, 2020. *Laboratory Biosafety Manual, 4th ed.*, Geneva: s.n.

## TENTANG PENULIS



**Dr. Ir. Juliana Christyaningsih, M.Kes.**, lahir di Surabaya, 1 Juli. Saat ini penulis tinggal di Kota Surabaya. Pendidikan terakhir adalah Doktor Ilmu Kedokteran dari Universitas Airlangga Surabaya dengan konsentrasi Toksikologi dan Biokimia (lulus 2011). Aktivitas penulis saat ini selain mengajar pendidikan vokasi di Poltekkes Kemenkes Surabaya adalah sebagai Tim Penilai Akreditasi di Lembaga Akreditasi Mandiri Perguruan Tinggi Kesehatan (LAM-PTKes) sejak 2017 sampai sekarang, Reviewer nasional penelitian di lingkungan Poltekkes Kemenkes sejak 2021 sampai sekarang, Detaser Poltekkes Kemenkes dan Asesor Akreditasi Komisi Etik Penelitian Kesehatan. Jalin kerja sama dengan penulis via surel [juliana.christy123@gmail.com](mailto:juliana.christy123@gmail.com)



**Ratno Tri Utomo, S.ST., M.Si.**, lahir di Surabaya, 21 April 1982. Saat ini penulis tinggal di Kota Surabaya. Pendidikan terakhir adalah Magister Ilmu Forensik Fakultas Pascasarjana dari Universitas Airlangga Surabaya dengan konsentrasi Biologi Forensik (lulus 2023). Penulis juga merupakan lulusan D3 Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya (lulus 2004), Penulis juga merupakan lulusan D4 Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Surabaya (lulus 2011). Aktivitas penulis saat ini selain mengajar pendidikan vokasi di Poltekkes Kemenkes Surabaya adalah sebagai penanggung jawab laboratorium uji mikrobiologi laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Surabaya. Jalin kerja sama dengan penulis via surel [ratno\\_depeks@poltekkes-surabaya.ac.id](mailto:ratno_depeks@poltekkes-surabaya.ac.id)



**Jon Farizal, S.ST., M.Si.Med**, Lahir Palak Bengkerung, 15 Juni 1977 Merupakan Dosen Tetap di Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Bengkulu. **Jon Farizal** Mengampu Mata Kuliah Sitohistoteknologi, Anatomi Fisiologi, dan Flebotomi Teknik Sampling dengan Tugas Tambahan Sekretaris Jurusan Teknologi Laboratorium Medis 2025-2029 dan Anggota Senat Poltekkes Kemenkes Bengkulu (2025-2029). Email : jonfarizal@poltekkesbengkulu.ac.id



**Gladies Mercya Grameinie, S.Si., M.Biomed** lahir di Bekasi pada 7 Mei 1987. Pendidikan S1 Biologi FMIPA di Universitas Negeri Jakarta, lulus tahun 2010. Pendidikan S2 Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran di Universitas Indonesia, lulus tahun 2016. Saat ini bekerja sebagai Dosen Biokimia di Fakultas Kedokteran Universitas Pelita Harapan. Beberapa Buku yang sudah diterbitkan (1) Buku Ekspresi dan Regulasi Gen: Teori dan Aplikasi dan (2) Buku Ilmu Kedokteran Dasar tahun 2024. Email: gladies.neolaka@uph.edu



**dr. Triani Hastuti Hatta, Sp.D.V.E., M.Kes., M.HPE., FINSDV** lahir di Ujung Pandang (Makassar), pada 6 Mei 1978. Beliau tercatat sebagai lulusan Universitas Hasanuddin, mulai dari Prodi S1, S2 dan Spesialis di bidang Demato-venereologi dan Estetik. **Triani Hastuti** merupakan dosen Departemen Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dengan bidang kepakaran Histologi Sistem Integumentum (kulit, rambut kuku, dan kelenjar kulit) dan Histologi Sistem Urinari. Email: triani.hatta@unhas.ac.id



**Dr. dr. Anandia Putriyuni, Sp.PA** lahir di Padang, tanggal 27 Juni 1977. Ia tercatat sebagai lulusan S3 Biomedik dan Spesialis Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Wanita yang kerap disapa Anandia ini adalah istri dari Dr. dr. Yevri Zulfiqar, Sp.B, Sp.U(K), M.Kes. Saat ini Anandia bertugas di RSUD dr. Rasidin Padang dan Dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah Padang, Sumatera Barat.



**dr. Fadhil Kurniawan**, lahir di Ujung Pandang pada 8 Desember 1995. Merupakan Lulusan pendidikan kedokteran di Universitas Hasanuddin. Selain menjalani aktivitas akademik Magister Biomedik nya di Indonesia, Fadhil juga pernah memperoleh kesempatan internasional sebagai *Awardee JASSO Scholarship, Government of Japan (2024)* dalam program *Exchange Research Student* di Tsukuba University, Japan, dengan konsentrasi pada bidang *Experimental Pathology*. Ia aktif dalam penelitian dan pengembangan ilmu kedokteran, khususnya di bidang Histologi dan Onkologi. Email : [fadhil0812@icloud.com](mailto:fadhil0812@icloud.com)



**dr. Nana Liana, Sp.PA** lahir di Padang, tanggal 11 April 1985. Ia tercatat sebagai lulusan Spesialis Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Wanita yang kerap disapa Nana ini adalah istri dari Eri Mardinal, SE. Saat ini Nana bertugas di RSI Siti Rahmah Padang dan Dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah Padang, Sumatera Barat.



**dr. Ghaniyyatul Khudri, M.Biomed.** lahir di Bukittinggi, pada 19 Juli 1992. Ia menyelesaikan pendidikan profesi dokter di Universitas Padjajaran (2015) dan *Master of Biomedicine* (M.Biomed) Pendidikan Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (2023). Wanita yang kerap disapa Yaya ini adalah anak dari pasangan M.Khudri (ayah) dan alm. Leli Emelia (ibu). Saat ini ia aktif sebagai staf pengajar di Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah.



**Dr. dr. Patricia Diana Prasetiyo, Sp.PA., M.H.Kes., M.Si.Med.** lahir di Kudus, pada 8 Maret 1986. Ia tercatat sebagai lulusan Spesialis Patologi Anatomi dan Progam Doktorat dari Universitas Diponegoro. Wanita yang kerap disapa Diana ini adalah anak dari pasangan Petrus Suharto Prasetiyo (ayah) dan Maria Lusisasi Gunawan (ibu). Istri dari Patrick Bayu dan Ibu dari Rafael Nathan Praditya ini juga merupakan dosen tetap di Fakultas Kedokteran Universitas Pelita harapan, saat ini ia juga aktif dalam profesional, publikasi, dan pembicara.



**dr Meta Zulyati Oktora, SpPA, M.Biomed** lahir di Padang, pada 2 Oktober 1984. Ia tercatat sebagai lulusan Universitas Andalas. Perempuan yang kerap disapa Meta ini adalah anak dari pasangan Zulkifli (ayah) dan Waryati (ibu). Pada saat ini **Meta merupakan** salah satu dosen Fakultas Kedokteran Universitas Baiturrahmah.

Email [metazulyantioktora@fk.unbrah.ac.id](mailto:metazulyantioktora@fk.unbrah.ac.id)



**dr. Denys Putra Alim, Sp.FM**, lahir di Surabaya, pada tanggal 15 Februari 1992. Ia tercatat sebagai lulusan dokter umum dari Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan setelah selesai internship di Waingapu NTT, Ia kemudian melanjutkan ke jenjang program pendidikan dokter spesialis Ilmu Kedokteran Forensik dan Medikolegal juga pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Prestasi yang pernah dicapai oleh dr. Denys antara lain juara 2 Oral Presentation di ICFMS Malaysia 2025 dan Juara 1 Oral Presentation di AFSN-APMLA Korea Selatan 2025. Saat ini dr. Denys aktif sebagai Staff Pengajar Kedokteran Forensik dan Medikolegal di Fakultas Kedokteran maupun sebagai Staff Ahli Medik di Rumah Sakit.



**apt, Besse Hardianti, M.Pharm.Sc., Ph.D**, lahir di Kab Wajo, pada 21 Februari 1978. Ia tercatat sebagai lulusan S1 dan Apoteker di Universitas Hasanuddin kemudian melanjutkan Pendidikan S2 di Universitas Toyama, Institute Natural Medicine bidang Pathogenic Biochemistry, dengan Beasiswa dari Pemerintah Indonesia yaitu BLN(Beasiswa Luar Negeri) selanjutnya. Berhasil merampungkan S3 melalui program by research dengan Beasiswa yang diberikan oleh (Japan Society of the Promoting of Science) JSPS program ROMPAKU di bidang Biologi Cancer dan Imunologi. Wanita yang kerap disapa Besse ini adalah bukanlah orang baru di dunia akademik. Besse bergabung sebagai salah seorang Dosen di Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar(STIFA) sejak 2009 dan pada saat menulis buku ini Besse Menjabat sebagai salah seorang Wakil Rektor Bidang Research, Inovasi dan Kolaborasi Universitas Almarisah Madani Makassar, yang telah berubah status dari STIFA Makassar.



**dr. Marliana Nurprilinda, Sp.P.A, M.H.Kes, FISQua** kelahiran Jakarta. Dosen Tetap dan Dokter Spesialis Patologi Anatomi ini tercatat sebagai lulusan Profesi Dokter alumni FK UKI (Universitas Kristen Indonesia) dan Dokter Spesialis alumni FK Universitas Diponegoro. Putri dari pasangan

Ir.D.M.Lumban Gaol (Ayah) dan Margaretha Dartini Ibrahim (Ibu). Dok Li, demikian sapaan diantara rekan kerja dan teman sejawatnya, istri dari Rudianto Pakpahan, ibu dari Christopher, Christie, Christian.

Berpengalaman mengisi acara edukasi kesehatan di sebuah radio dan salah satu nakes yang mendapatkan penghargaan atas partisipasi aktif menunjang program pemerintah dalam percepatan vaksinasi Covid-19 pada masa pandemi.



**A.R. Pratiwi Hasanuddin, S.Si., M.Biomed.** Penulis dilahirkan di Kabupaten Bulukumba pada tanggal 29 Juli 1993. Penulis berasal dari keluarga yang beradat Bugis. Selepas meraih Sarjana Sains di Universitas Hasanuddin (UNHAS), kemudian penulis melanjutkan Pendidikannya untuk meraih Magister Biomedik di Universitas Gadjah Mada (UGM). Saat ini penulis bekerja sebagai dosen tetap di

Program Studi DIII Analis Kesehatan STIKES Panrita Husada Bulukumba. Penulis pernah menjabat sebagai Sekertaris Program Studi DIII Teknologi Laboratorium Medis STIKES Panrita Husada Bulukumba dan sekarang menjabat sebagai Kepala Bagian Akademik, Riset, dan Inovasi di STIKES Panrita Husada Bulukumba. Sehari-harinya bekerja sebagai dosen pengampu mata kuliah Bakteriologi, Biologi Molekuler, Parasitologi, Mikologi, dan Sitohitoteknologi.

Email Penulis: [a.r.pratiwihasanuddin@gmail.com](mailto:a.r.pratiwihasanuddin@gmail.com)