

Imunohistokimia pada Kanker Payudara: Teknik, Aplikasi, dan Implikasinya dalam Diagnostik dan Terapi

Ois Nurcahyanti¹, Kusmardi²

¹Program Doktor Ilmu
Biomedik,

²Departemen Patologi
Anatomik, Fakultas
Kedokteran,
Universitas Indonesia
Jakarta

Penulis korespondensi:
Prof. Dr. Drs., Kusmardi, MS,
Departemen Patologi Anatomik,
Fakultas Kedokteran, Universitas
Indonesia
Jakarta
Indonesia

PENDAHULUAN

Imunohistokimia (IHK) adalah sebuah teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan distribusi antigen spesifik dalam jaringan dengan menggunakan antibodi yang terikat pada pewarnaan.¹ Teknik ini memanfaatkan prinsip interaksi spesifik antara antigen dan antibodi, di mana antibodi yang ditandai dengan zat pewarna atau enzim akan berikatan dengan antigen target di dalam sampel jaringan, sehingga memungkinkan visualisasi dan identifikasi antigen tersebut di bawah mikroskop.²

IHK memiliki peran yang sangat penting dalam bidang patologi dan biomedis, terutama dalam diagnosis dan penentuan prognosis berbagai jenis kanker, termasuk kanker payudara. Dalam konteks kanker payudara, IHK digunakan untuk mengevaluasi ekspresi protein tertentu seperti reseptor estrogen (ER), reseptor progesteron (PR), dan HER2.³ Informasi mengenai ekspresi protein-protein ini sangat penting karena dapat mempengaruhi pengambilan keputusan klinis terkait dengan jenis terapi yang akan diberikan kepada pasien. Sebagai contoh, keberadaan reseptor hormon seperti ER dan PR dapat menjadi indikasi bahwa pasien mungkin akan merespon baik terhadap terapi hormon, sedangkan overekspresi HER2 dapat mengarahkan dokter untuk mempertimbangkan terapi yang menargetkan HER2.⁴

Penentuan skor imunohistokimia pada jaringan kelenjar mammae dilakukan dengan mengevaluasi intensitas pewarnaan dan proporsi sel yang menunjukkan pewarnaan positif. Skor ini kemudian digunakan untuk mengklasifikasikan tingkat ekspresi antigen yang relevan, yang pada akhirnya dapat membantu dalam memprediksi respon terhadap terapi dan menentukan prognosis pasien. Dengan demikian, IHK tidak hanya memberikan informasi diagnostik yang berharga, tetapi juga membantu dalam personalisasi pengobatan kanker, meningkatkan peluang keberhasilan terapi, dan mengurangi efek samping yang tidak perlu.⁵

Selain itu, IHK juga digunakan dalam penelitian untuk memahami mekanisme penyakit dan perkembangan obat baru.⁶ Dalam bidang penelitian kanker, IHK membantu dalam identifikasi biomarker yang dapat digunakan untuk skrining, diagnosis dini, dan pemantauan respons terhadap terapi.⁷ Kemajuan teknologi dan peningkatan dalam spesifitas serta sensitivitas antibodi, IHK terus berkembang sebagai alat yang esensial dalam praktik klinis dan penelitian biomedis.⁸

Secara keseluruhan, teknik imunohistokimia merupakan alat yang sangat berguna dalam praktik klinis modern, memungkinkan deteksi dan karakterisasi molekuler yang lebih akurat dari penyakit, serta mendukung pendekatan pengobatan yang lebih terarah dan efektif.⁹ IHK tidak hanya meningkatkan pemahaman kita tentang patofisiologi penyakit tetapi juga memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk pengembangan terapi baru dan strategi pengobatan yang lebih baik.¹⁰

Tujuan

1. Memahami dasar teori dan konsep imunohistokimia dan dapat menghitung hasil pulasan IHK
2. Memahami marker IHK dalam kanker payudara
3. Menganalisis pengaruh hasil IHK terhadap pilihan terapi
4. Mengetahui perkembangan terkini teknologi baru dalam IHK

Manfaat

Dapat memahami konsep dasar IHK dan menghitung hasil dari pulasan IHK, Teknik IHK, dan disamping itu dapat menganalisis hasil IHK terhadap pilihan terapi

DASAR TEORI DAN KONSEP IMUNOHISTOKIMIA

Definisi Imunohistokimia

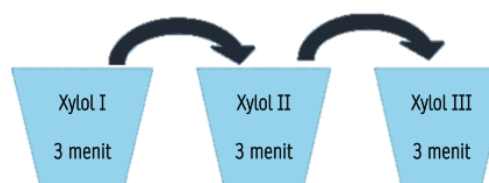
Imunohistokimia (IHK) adalah teknik laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan lokasi spesifik protein atau antigen dalam sampel jaringan menggunakan antibodi. Teknik ini menggabungkan prinsip imunologi dengan teknik histokimia untuk memberikan visualisasi distribusi molekuler pada tingkat jaringan. Dalam IHK, antibodi yang spesifik terhadap antigen target diinkubasi dengan sampel jaringan. Setelah itu, reaksi antara antibodi dan antigen dideteksi menggunakan berbagai metode, seperti penggunaan enzim atau fluorokrom yang menghasilkan sinyal visual. Hasil dari IHK biasanya diamati di bawah mikroskop, memungkinkan peneliti atau diagnostik untuk mengidentifikasi distribusi dan jumlah antigen tertentu dalam konteks histologis jaringan. Teknik ini sangat penting dalam berbagai bidang penelitian biomedis dan diagnostik klinis, terutama dalam patologi untuk identifikasi dan klasifikasi berbagai jenis kanker, termasuk kanker payudara. Dengan menggunakan IHK, adalah mungkin untuk mengevaluasi ekspresi protein yang berperan dalam perkembangan penyakit, memberikan informasi prognostik, dan memandu pilihan terapi.

Prinsip Dasar Imunohistokimia

Imunohistokimia bekerja dengan prinsip dasar mengikatkan antibodi spesifik terhadap antigen target yang ada dalam jaringan.¹¹ Proses ini melibatkan beberapa langkah utama:

1. Penyiapan sampel jaringan
 - a. Biopsi atau bedah: jaringan diambil melalui biopsi atau operasi.

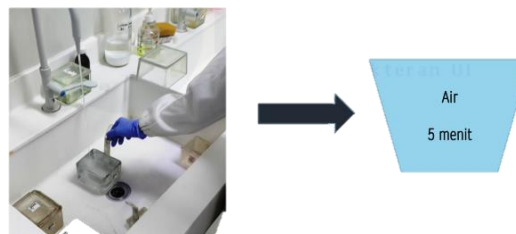
- b. Pemotongan: sampel jaringan dipotong menjadi ukuran yang sesuai untuk diproses lebih lanjut.
2. Fiksasi jaringan
 - a. Potongan jaringan kanker payudara dimasukkan dalam larutan bufer formalin (dibuat dari larutan formalin 10% dalam Bufer Natrium Asetat sampai mencapai pH 7,0)
 - b. Jaringan dipotong dengan ketebalan 3-5 mm dengan pisau (*scalpel*).
 3. *Embedding*: jaringan dipotong menjadi potongan tipis dan dipasang pada slide.
 4. Deparaffinisasi dan rehidrasi: slide jaringan diproses untuk menghilangkan parafin dan merehidrasi jaringan.



Gambar 1. Parafin pada jaringan (slide) dihilangkan dengan menggunakan Xylool.



Gambar 2. Kandungan xylol dalam jaringan dihilangkan menggunakan alkohol 100% dan digantikan dengan air menggunakan alkohol dengan konsentrasi lebih rendah (80%, 70%, 50%).



Gambar 3. Pencucian menggunakan air mengalir (*deionized water*).

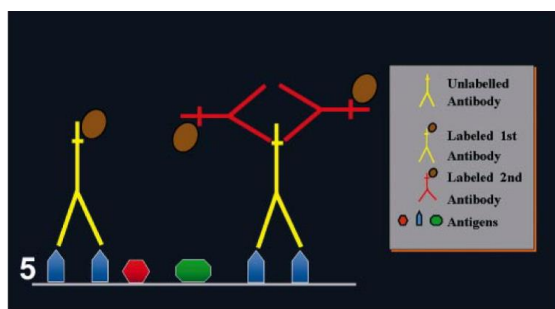
5. *Antigen retrieval*: proses ini dilakukan untuk memulihkan antigen yang mungkin telah termodifikasi selama fiksasi.
6. Pewarnaan: antibodi primer diaplikasikan untuk mengikat antigen target, diikuti oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan enzim atau fluorokrom untuk visualisasi.
7. Pengamatan dan analisis: jaringan yang telah diwarnai diamati di bawah mikroskop untuk menentukan ekspresi antigen target.

Teknik IHK

Teknik Imunohistokimia (IHK) digunakan dalam biologi sel dan histologi untuk mendeteksi lokasi dan distribusi protein spesifik dalam sampel jaringan menggunakan antibodi dan metode pewarnaan. Berikut adalah beberapa teknik IHK yang umum digunakan:¹²⁻¹⁵

1. Metode Langsung

Metode langsung dalam IHK melibatkan penggunaan antibodi primer yang telah dikonjugasi dengan label, baik fluorescent atau enzimatis. Antibodi primer ini akan langsung mengikat antigen target dalam jaringan. Setelah pengikatan, keberadaan antigen dapat dideteksi melalui sinyal yang dihasilkan oleh label yang terikat pada antibodi. Dalam metode ini, tidak ada antibodi sekunder yang digunakan, sehingga prosesnya lebih cepat dan lebih sedikit langkah yang diperlukan dibandingkan dengan metode tidak langsung atau teknik amplifikasi lainnya.¹⁶ Berikut Gambar 4. merupakan gambaran metode imunoperoxidase langsung dan tidak langsung.



Gambar 4. Metode imunoperoxidase langsung dan tidak langsung.¹²

Salah satu kelebihan utama dari metode langsung adalah kecepatan dan kesederhanaannya. Karena hanya menggunakan satu antibodi yang telah dilabeli, prosesnya lebih cepat dibandingkan metode tidak langsung yang memerlukan dua langkah pengikatan antibodi (primer dan sekunder). Ini membuat metode langsung ideal untuk situasi di mana hasil cepat sangat penting, seperti dalam diagnosis klinis tertentu atau penelitian yang memerlukan analisis cepat. Metode langsung mengurangi jumlah langkah yang diperlukan dalam prosedur IHK, yang pada gilirannya mengurangi kemungkinan kesalahan teknis. Dengan lebih sedikit langkah, ada lebih sedikit peluang untuk variabilitas teknis dan kesalahan, yang dapat menghasilkan hasil yang lebih konsisten dan dapat diandalkan. Dengan mengurangi jumlah reagen dan langkah pencucian, metode langsung juga mengurangi risiko kontaminasi. Ini sangat penting dalam konteks diagnostik, di mana

keakuratan hasil sangat penting. Meskipun biaya antibodi primer yang dikonjugasi bisa lebih tinggi, pengurangan langkah kerja dan waktu laboratorium bisa mengimbangi biaya ini. Dalam beberapa kasus, metode langsung bisa lebih ekonomis dibandingkan dengan metode yang memerlukan antibodi sekunder dan reagen tambahan.¹⁷

Adapun kekurangan metode ini adalah sensitivitas yang lebih rendah. Dalam metode ini, hanya ada satu lapisan antibodi yang mengikat antigen, sehingga sinyal yang dihasilkan cenderung lebih lemah dibandingkan dengan metode tidak langsung yang menggunakan antibodi sekunder untuk amplifikasi sinyal. Ini bisa menjadi masalah terutama ketika antigen target memiliki ekspresi yang rendah dalam sampel. Meskipun metode langsung mengurangi risiko kontaminasi, risiko background staining masih ada, terutama jika antibodi primer tidak cukup spesifik. Background staining dapat mengganggu interpretasi hasil dan mengurangi keakuratan diagnosis. Spesifisitas antibodi primer sangat penting dalam metode langsung. Jika antibodi primer tidak cukup spesifik, hasilnya bisa menyesatkan. Oleh karena itu, pemilihan dan validasi antibodi primer adalah langkah kritis dalam metode ini. Metode langsung cenderung kurang fleksibel untuk aplikasi multiplexing dibandingkan dengan metode lain. Penggunaan beberapa antibodi primer yang dilabeli dalam satu eksperimen bisa menjadi rumit dan seringkali memerlukan optimasi yang cermat untuk menghindari sinyal tumpang tindih dan memastikan hasil yang dapat diinterpretasikan.¹⁷

2. Metode tidak langsung

Metode tidak langsung dalam IHK melibatkan dua tahap utama: pertama, penggunaan antibodi primer yang tidak dilabeli untuk mengikat antigen target, dan kedua, penggunaan antibodi sekunder yang dilabeli untuk mengikat antibodi primer. Proses ini menghasilkan amplifikasi sinyal karena satu antibodi primer dapat mengikat beberapa antibodi sekunder, meningkatkan visibilitas antigen yang terdeteksi.²

Salah satu kelebihan utama dari metode tidak langsung adalah sensitivitasnya yang lebih tinggi. Karena beberapa antibodi sekunder dapat berikatan dengan satu antibodi primer, sinyal yang dihasilkan diperkuat, memungkinkan deteksi antigen yang diekspresikan pada tingkat yang sangat rendah. Metode tidak langsung menawarkan fleksibilitas yang lebih besar dalam pemilihan antibodi. Satu jenis antibodi sekunder yang dilabeli dapat digunakan dengan berbagai antibodi primer

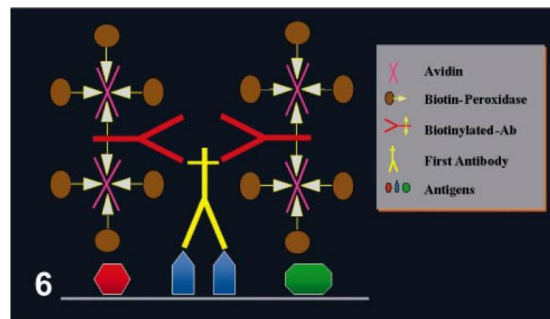
yang tidak dilabeli, asalkan mereka dihasilkan dalam spesies yang berbeda. Ini mengurangi kebutuhan untuk memiliki antibodi primer yang dilabeli untuk setiap target antigen, yang bisa sangat mahal dan tidak praktis. Metode tidak langsung memungkinkan deteksi simultan beberapa antigen dalam satu sampel dengan menggunakan antibodi primer yang berasal dari spesies yang berbeda dan antibodi sekunder yang dilabeli dengan fluorofor atau enzim yang berbeda. Hal ini memungkinkan analisis kompleks dari beberapa target dalam satu eksperimen, yang sangat berharga dalam penelitian yang memerlukan informasi multipel dari satu sampel.^{12,16}

Adapun kekurangan metode ini adalah Metode tidak langsung lebih kompleks dan memerlukan waktu lebih lama dibandingkan metode langsung. Proses dua langkah ini memerlukan lebih banyak langkah inkubasi dan pencucian, yang meningkatkan durasi keseluruhan prosedur. Kompleksitas tambahan ini juga meningkatkan potensi kesalahan teknis dan variabilitas antar laboratorium. Risiko background staining atau sinyal non-spesifik bisa lebih tinggi dalam metode tidak langsung karena adanya lebih banyak langkah dan reagen. Hal ini bisa mengganggu interpretasi hasil dan mengurangi keakuratan diagnosis. Meskipun antibodi sekunder dapat digunakan untuk berbagai antibodi primer, biaya keseluruhan bisa lebih tinggi karena memerlukan lebih banyak reagen dan langkah kerja. Penggunaan antibodi sekunder yang dilabeli juga menambah biaya tambahan.¹⁷

3. Metode Avidin Biotin

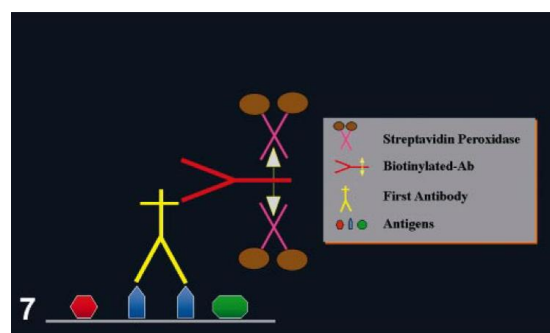
Avidin adalah glikoprotein besar yang diekstraksi dari putih telur, memiliki empat situs pengikatan per molekul dan afinitas tinggi terhadap vitamin bermassa molekul rendah yang disebut biotin. Biotin memiliki satu situs pengikatan untuk avidin dan dapat diikat melalui situs lain ke antibodi (antibodi yang dibiotinilasi) atau makromolekul lain, seperti enzim, fluorokrom, atau label lainnya. Sensitivitas metode avidin-biotin meningkat karena jumlah molekul biotin (dan karena itu molekul label) yang lebih banyak dapat diikat pada antibodi primer. Metode Kompleks Avidin-Biotin (ABC) adalah salah satu metode avidin-biotin yang paling umum. Dalam metode ini, antibodi sekunder dibiotinilasi dan reagen ketiga adalah kompleks avidin yang dicampur dengan biotin yang terikat dengan label yang sesuai. Avidin dan biotin berlabel dibiarkan bereaksi bersama selama sekitar 30 menit sebelum diaplikasikan, menghasilkan pembentukan kompleks besar dengan banyak molekul label (misalnya, enzim).^{12,16} Proporsi avidin terhadap biotin

berlabel harus sedemikian rupa sehingga beberapa situs pengikatan avidin ke biotin berlabel tetap bebas untuk mengikat biotin pada antibodi sekunder. Berikut Gambar 5 adalah Metode Kompleks Avidin-Biotin (ABC) seperti yang telah dijelaskan di atas.



Gambar 5. Metode Kompleks Avidin-Biotin (ABC).¹²

Metode avidin-biotin lain yang sering digunakan adalah metode avidin-biotin berlabel (LAB) atau streptavidin-biotin berlabel (LSAB). Metode ini menggunakan antibodi sekunder yang dibiotinilasi dan reagen ketiga berupa avidin yang berlabel peroksidase (atau fosfatase alkali). Sensitivitas metode ini lebih tinggi dibandingkan metode ABC standar.¹⁶ Berikut Gambar 6. Metode avidin-biotin berlabel (LAB) atau streptavidin-biotin berlabel (LSAB) seperti yang dijelaskan di atas.



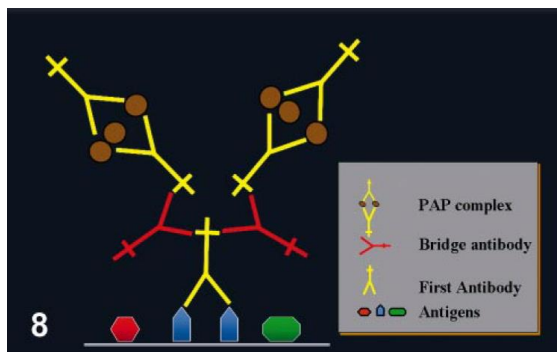
Gambar 6. Metode avidin-biotin berlabel (LAB) atau streptavidin-biotin berlabel (LSAB)¹²

Metode avidin-biotin memberikan sensitivitas tinggi dalam deteksi antigen karena kemampuan untuk mengikat sejumlah besar molekul label ke antibodi primer. Hal ini membuat metode ini sangat berguna dalam berbagai aplikasi diagnostik dan penelitian, termasuk deteksi protein spesifik dalam jaringan, analisis distribusi protein, dan penelitian pengembangan obat. Meski demikian, metode ini memiliki biaya yang relatif tinggi dan risiko background staining yang harus dikelola dengan hati-hati untuk

memastikan hasil yang akurat dan dapat diandalkan.¹⁶

4. Peroxidase-antiperoxidase (PAP)

Metode Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) menggunakan enzim peroksidase yang berikatan dengan antibodi, di mana antibodi primer dan PAP yang digunakan adalah mouse monoclonal maka PAP juga harus dalam mouse, begiru juga bila antibodi primer spesies rabbit. Metode ini adalah metode tidak langsung yang terdiri dari tiga lapisan. Metode ini melibatkan lapisan ketiga yang, untuk antibodi primer dari kelinci, merupakan antiperoxidase kelinci yang dikonjugasikan dengan peroksidase dalam proporsi yang membentuk kompleks stabil (peroksidase-antiperoxidase) yang terdiri dari dua molekul IgG kelinci yang digabungkan dengan tiga molekul peroksidase, salah satunya mereka berbagi.¹² Berikut Gambar 7 merupakan gambaran metode PAP seperti yang dijelaskan di atas.



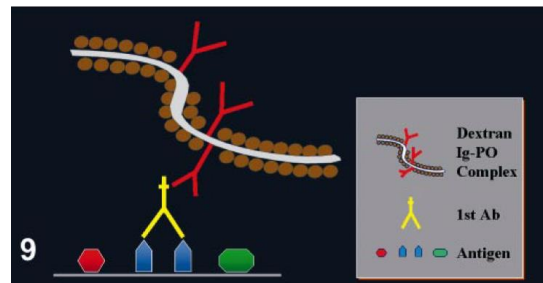
Gambar 7. Metode Peroxidase-Antiperoxidase (PAP)¹²

Kelebihan Metode PAP adalah memiliki sensitivitas 100-1.000 kali lebih tinggi dibandingkan metode tidak langsung dua langkah. Hal ini memungkinkan deteksi antigen dengan ekspresi rendah dalam sampel jaringan. Disamping itu PAP reagen tersedia untuk digunakan dengan antibodi primer dari berbagai spesies, termasuk kambing, tikus, kelinci, tikus, dan manusia. Kekurangan Metode PAP adalah PAP lebih rumit dan memerlukan lebih banyak langkah dibandingkan metode tidak langsung dua langkah, sehingga lebih memakan waktu dan tenaga. Meskipun metode PAP pernah sangat populer sebelum adanya metode avidin-biotin, sensitivitasnya yang lebih rendah membatasi penggunaannya saat ini.¹⁶

5. Metode *Polymeric labeling two-step method*

Metode polimer dalam imunohistokimia menggunakan polimer kompak yang terkonjugasi dengan banyak molekul enzim dan antibodi sekunder spesifik untuk antibodi

primer. Struktur polimer ini memungkinkan beberapa enzim dan antibodi sekunder terikat, meningkatkan efisiensi dan sensitivitas metode ini.¹² Berikut Gambar 8 Imunoperoxidase berbasis polimer dua langkah. Reagen sekunder memiliki banyak molekul label dan antigen sekunder yang melekat pada tulang punggung polimer.



Gambar 8. Imunoperoxidase berbasis polimer dua langkah. Reagen sekunder memiliki banyak molekul label dan antigen sekunder yang melekat pada tulang punggung polimer.¹²

Keunggulan Metode Polimer adalah lebih sederhana dibandingkan dengan metode tiga langkah seperti metode Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) atau metode Kompleks Avidin-Biotin (ABC). Hal ini mengurangi waktu pengerjaan dan jumlah langkah yang diperlukan, sehingga lebih praktis untuk digunakan dalam setting klinis maupun penelitian. Sensitivitas metode polimer sama atau lebih tinggi dibandingkan dengan metode ABC atau Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB). Hal ini memungkinkan deteksi antigen dengan ekspresi rendah dalam sampel jaringan, memberikan hasil yang lebih akurat dan dapat diandalkan. Tidak adanya biotin endogen atau avidin dalam metode polimer mengurangi risiko pewarnaan latar belakang yang dapat mengganggu interpretasi hasil. Ini membuat metode ini lebih spesifik dan menghasilkan gambar yang lebih jelas dan bersih. Salah satu kelemahan utama metode polimer adalah biaya yang biasanya lebih tinggi dibandingkan dengan metode ABC atau LSAB. Meskipun demikian, biaya tambahan ini sering kali dianggap sepadan dengan keunggulan yang ditawarkan, terutama dalam hal sensitivitas dan kemudahan penggunaan.¹⁶

Berbagai perusahaan telah mengkomersialkan sistem deteksi berbasis polimer yang tersedia di pasar, termasuk:

- EnVision™: Sistem ini menawarkan keunggulan dalam hal sensitivitas dan spesifisitas tinggi, serta kemudahan penggunaan yang signifikan.
- PowerVision™: Dikenal dengan performanya yang konsisten dan dapat diandalkan, PowerVision™ adalah salah satu

pilihan populer di laboratorium diagnostik dan penelitian.

- c. ImmPRESS™: ImmPRESS™ menawarkan kemudahan dalam aplikasi dan hasil yang berkualitas tinggi, menjadikannya alat yang berharga untuk berbagai aplikasi imunohistokimia.¹²

6. Tyramide Signal Amplification (TSA)

Metode Tyramide Signal Amplification (TSA) didasarkan pada kemampuan tyramide untuk melekat secara kimia pada substrat padat (misalnya, irisan jaringan) setelah mengalami oksidasi/radikalisasi. Metode ini pertama kali diadaptasi untuk imunohistokimia oleh Adams. Prosedur ini melibatkan deposisi tyramide yang dibiotinilasi di lokasi reaksi antigen-antibodi, yang dikatalisis oleh horseradish peroxidase (HRP). Intermediet yang sangat reaktif yang terbentuk selama reaksi HRP-tyramide akan mengikat pada residu tirosin yang kaya pada protein di sekitar situs pengikatan HRP melalui produksi radikal bebas oleh oksigen yang dibebaskan oleh HRP.¹²

Kelebihan Metode TSA adalah Sensitivitas tinggi, metode TSA dapat meningkat 5-10 kali lipat dibandingkan metode avidin-biotin biasa. Beberapa laporan bahkan menyebutkan peningkatan sensitivitas yang lebih tinggi. Hal ini membuat metode TSA sangat cocok untuk mendeteksi antigen yang hadir dalam jumlah sangat kecil dalam jaringan. Deposisi tyramide yang dibiotinilasi terjadi hanya di lokasi reaksi antigen-antibodi, sehingga memberikan hasil pewarnaan yang sangat spesifik dan mengurangi pewarnaan latar belakang yang tidak diinginkan.¹⁶

Kekurangan Metode TSA adalah Prosedur yang Kompleks, Metode TSA lebih rumit dan memerlukan lebih banyak langkah dibandingkan metode avidin-biotin standar. Ini termasuk prosedur awal avidin-biotin diikuti dengan reaksi tyramide, sehingga lebih memakan waktu dan tenaga. Pewarnaan latar belakang dapat menjadi masalah, terutama dengan teknik retrieval antigen berbasis pemanasan (HIER). Dalam kasus ini, diperlukan perlakuan yang lebih lama untuk menghilangkan aktivitas peroksidase endogen atau aktivitas avidin-biotin endogen.¹⁶

7. Immuno-rolling circle amplification

Tujuan utama teknik Rolling Circle Amplification (RCA) adalah untuk meningkatkan sinyal reaksi imunologis tanpa meningkatkan kebisingan (latar belakang), yang sering terjadi pada metode amplifikasi tyramide. RCA adalah replikasi DNA yang teranchoring pada permukaan yang dapat digunakan untuk memvisualisasikan antigen (Ag) melalui reaksi

imunologis yang disebut immunoRCA. Teknik ini menggabungkan reaksi imunologis (pengikatan Ag-Ab) dengan amplifikasi asam nukleat isotermal menggunakan probe oligonukleotida yang disirkularisasi.¹²

Kelebihan Teknik RCA adalah RCA mampu meningkatkan sinyal reaksi imunologis secara signifikan tanpa meningkatkan kebisingan latar belakang, membuat hasil pewarnaan lebih spesifik dan jelas. Berbeda dengan reaksi berantai polimerase (PCR), RCA dapat mengamplifikasi segmen asam nukleat baik secara linear maupun geometrik di bawah kondisi isotermal, dan produk amplifikasinya tetap terhubung dengan molekul target. RCA memiliki sensitivitas yang cukup tinggi untuk mendeteksi kompleks Ag-Ab tunggal. Mode linear RCA dapat menghasilkan amplifikasi sinyal hingga 10^5 kali lipat selama reaksi enzimatis singkat.¹⁶

Kekurangan Teknik RCA adalah RCA lebih kompleks dibandingkan metode amplifikasi sinyal lainnya dan memerlukan pengetahuan serta keterampilan khusus melaksanakan prosedurnya dengan tepat. Reagen khusus seperti DNA sirkular dan probe oligonukleotida yang telah dilabeli mungkin tidak selalu tersedia dan bisa lebih mahal.¹⁷

Metode Penentuan Skor IHK

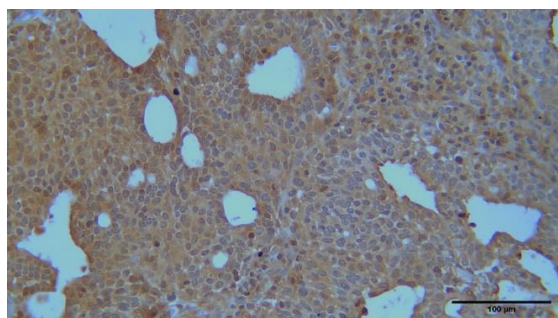
Penentuan skor imunohistokimia kelenjar mammae biasanya dilakukan berdasarkan intensitas pewarnaan dan persentase sel yang diwarnai. Terdapat beberapa sistem skoring yang umum digunakan, di antaranya:

1. Skor Allred

Skor Allred adalah sistem penilaian yang digunakan dalam pemeriksaan imunohistokimia (IHK) untuk mengevaluasi ekspresi reseptor hormon, seperti reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR), pada jaringan kanker payudara.¹⁸ Skor ini menggabungkan dua komponen utama:

- a. Intensitas Pewarnaan (I): dinilai pada skala 0 hingga 3, di mana:
 - 0: Tidak ada pewarnaan
 - 1: Pewarnaan lemah
 - 2: Pewarnaan sedang
 - 3: Pewarnaan kuat
- b. Persentase sel yang diwarnai (P): dinilai pada skala 0 hingga 5, yang mencerminkan persentase sel kanker yang menunjukkan reaksi pewarnaan, yaitu:
 - 0: Tidak ada sel yang diwarnai
 - 1: Kurang dari 1% sel yang diwarnai
 - 2: 1-10% sel yang diwarnai
 - 3: 11-33% sel yang diwarnai
 - 4: 34-66% sel yang diwarnai
 - 5: 67-100% sel yang diwarnai

Kedua nilai ini kemudian dijumlahkan untuk mendapatkan Skor Allred yang berkisar antara 0 hingga 8. Skor ini memberikan informasi tentang tingkat ekspresi reseptor hormon dalam jaringan kanker payudara, yang penting dalam menentukan strategi pengobatan dan prognosis pasien. Semakin tinggi skor Allred, semakin kuat dan meluas ekspresi reseptor hormon dalam jaringan kanker payudara, yang biasanya dikaitkan dengan respons yang lebih baik terhadap terapi hormonal. Contoh penilaian dengan sistem ini adalah seperti pada Gambar 9.



Gambar 9. Gambaran ekspresi EGFR dari jaringan kanker payudara tikus yang diinduksi DMBA menggunakan pewarnaan imunohistokimia (scale bar=100 μm). Perbesaran 400 kali.¹⁹

Pada Gambar 9, jika kita menggunakan metode AllRed maka:

- Intensitas pewarnaan: 3 (pewarnaan kuat).
- Persentase sel yang diwarnai: 5 (67-100% sel yang diwarnai).
- Skor Total: 3+5=8.

Skor 8 pada pewarnaan Allred menunjukkan ekspresi reseptor hormon yang sangat kuat dalam jaringan kanker payudara. Ekspresi EGFR ditandai dengan keberadaan sel yang terwarnai cokelat pada membran sel dan sitoplasma. Pada Tikus Kanker payudara yang diinduksi DMBA hampir semua membran sel terwarnai cokelat dengan intensitas sedang hingga kuat yang menutupi membran dan sitoplasma.

2. Skor H (H-Score)

Skor H (H-Score) adalah metode alternatif untuk mengevaluasi ekspresi reseptor hormon, seperti reseptor estrogen (ER) dan reseptor progesteron (PR), dalam pemeriksaan imunohistokimia (IHK). Metode ini memperhitungkan kedua komponen utama, yaitu intensitas pewarnaan dan persentase sel yang diwarnai, tetapi memiliki pendekatan yang sedikit berbeda dalam penghitungannya. Dalam Skor H, nilai intensitas pewarnaan (I) dan persentase sel yang diwarnai (P) dikalikan

bersama untuk setiap tingkat intensitas pewarnaan. Misalnya, jika ada 3 tingkat intensitas pewarnaan (0, 1, 2, 3), maka untuk setiap tingkat intensitas tersebut, nilai P dikalikan dengan nilai I, dan totalnya dijumlahkan.^{20,21} Formula umumnya adalah:

$$H - Score = \sum_{i=1}^n (P_i \times I_i)$$

Ket: P_i adalah persentase sel yang diwarnai pada tingkat intensitas pewarnaan, I_i adalah nilai intensitas pewarnaan pada tingkat

Skor H memiliki rentang nilai yang lebih luas daripada Skor Allred dan dapat memberikan gambaran yang lebih rinci tentang ekspresi reseptor hormon dalam jaringan kanker. Contoh penilaian dengan sistem H-score ini pada Gambar 9. Ekspresi protein EGFR pada tikus yang diinduksi DMBA jika dihitung dengan sistem H-Score maka dibutuhkan bantuan software ImageJ untuk menilai presentase intensitas dari hasil pulasan. Berikut adalah contoh hasil penilaian dengan menggunakan Image J. Contoh Hasil dari imageJ:

- Intensitas pewarnaan 0: persentase sel yang diwarnai adalah 39.36%
 $P_0 = 39,36\%, I_0 = 0$
 $H_0 = P_0 \times I_0 = 39,36 \times 0 = 0$
- Intensitas pewarnaan 1: persentase sel yang diwarnai adalah 31%
 $P_1 = 31\%, I_1 = 1$
 $H_1 = P_1 \times I_1 = 31 \times 1 = 31$
- Intensitas pewarnaan 2: persentase sel yang diwarnai adalah 20%
 $P_2 = 20\%, I_2 = 2$
 $H_2 = P_2 \times I_2 = 20 \times 2 = 40$
- Intensitas pewarnaan 3: persentase sel yang diwarnai adalah 9.64%
 $P_3 = 9,64\%, I_3 = 3$
 $H_3 = P_3 \times I_3 = 9,64 \times 3 = 28,92$

Jumlahkan semua nilai yang dihitung, maka nilai intensitas protein tersebut adalah 99,92:

$$H - Score = H_0 + H_1 + H_2 + H_3$$

$$H - Score = 0 + 31 + 40 + 28,92$$

$$H - Score = 99,92$$

Faktor-faktor yang Mempengaruhi Hasil Imunohistokimia

Keberhasilan dan keakuratan hasil imunohistokimia (IHK) sangat bergantung pada sejumlah faktor yang mempengaruhi setiap tahap proses. Pemahaman yang mendalam tentang faktor-faktor ini adalah kunci untuk mengoptimalkan hasil dan mengurangi potensi kesalahan. Berikut adalah beberapa faktor utama yang mempengaruhi hasil IHK:^{16-21,22-27}

1. Kualitas sampel

- a. Pengambilan jaringan: proses pengambilan sampel jaringan harus dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari kerusakan mekanis dan kontaminasi. Teknik biopsi yang baik sangat penting untuk memastikan integritas struktur jaringan.
- b. Pengawetan: pengawetan jaringan segera setelah pengambilan sangat penting untuk mencegah degradasi antigen. Metode yang umum digunakan adalah fiksasi dengan formalin yang kemudian diikuti dengan embedding dalam parafin.
- c. Pemrosesan jaringan: proses pemotongan jaringan menjadi irisan tipis harus dilakukan dengan mikrotom yang baik untuk menghasilkan irisan dengan ketebalan yang konsisten dan bebas dari artefak.

2. Spesifisitas dan aviditas antibodi

- a. Pemilihan antibodi: antibodi yang digunakan harus spesifik terhadap antigen target. Penggunaan antibodi yang tidak spesifik dapat menyebabkan hasil false positive karena ikatan dengan antigen lain.
- b. Kualitas antibodi: antibodi dengan aviditas tinggi akan mengikat antigen target dengan lebih kuat dan stabil, meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi.

3. Kondisi inkubasi

- a. Suhu inkubasi: inkubasi antibodi biasanya dilakukan pada suhu kamar atau 4°C. Suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi antibodi atau antigen, sedangkan suhu yang terlalu rendah dapat memperlambat reaksi.
- b. Waktu inkubasi: waktu inkubasi yang optimal sangat penting untuk memastikan ikatan yang efisien antara antibodi dan antigen. Waktu yang terlalu singkat mungkin tidak cukup untuk ikatan maksimal, sementara waktu yang terlalu lama dapat meningkatkan latar belakang non-spesifik.

4. Blocking dan pengendalian non-spesifik

- a. Blocking: sebelum aplikasi antibodi, irisan jaringan biasanya diinkubasi dengan larutan blocking yang mengandung protein seperti serum hewan atau BSA (bovine serum albumin) untuk menutupi situs ikatan non-spesifik. Blocking yang tidak memadai dapat

menyebabkan latar belakang yang tinggi.

- b. Kontrol non-spesifik: penggunaan kontrol negatif (tanpa antibodi primer) dan kontrol positif (dengan antigen yang diketahui) sangat penting untuk memastikan spesifisitas reaksi.

5. Deteksi dan amplifikasi sinyal

- a. Metode deteksi: deteksi enzimatik (misalnya, menggunakan peroksidase atau alkali fosfatase) dan deteksi fluoresen adalah dua metode utama. Setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan terkait sensitivitas, spesifisitas, dan kemudahan interpretasi.
- b. Amplifikasi sinyal: teknik amplifikasi seperti penggunaan avidin-biotin atau sistem polimer dapat meningkatkan sensitivitas deteksi dengan memperkuat sinyal, memungkinkan visualisasi antigen dengan konsentrasi rendah.

6. Interpretasi hasil

- a. Keahlian operator: interpretasi hasil IHK memerlukan keahlian teknis dan klinis untuk menganalisis pola pewarnaan dan intensitas sinyal dengan benar. Pengalaman dan pelatihan yang memadai sangat penting untuk menghindari kesalahan interpretasi.
- b. Kontrol kualitas: penerapan prosedur kontrol kualitas yang ketat, termasuk penggunaan kontrol positif dan negatif yang konsisten, adalah kunci untuk memastikan keandalan hasil.

7. Teknologi dan peralatan

- a. Kondisi mikroskop: penggunaan mikroskop dengan kualitas optik yang baik sangat penting untuk visualisasi yang jelas dan akurat. Mikroskop fluoresen harus dilengkapi dengan filter yang sesuai untuk fluorokrom yang digunakan.
- b. Peralatan laboratorium: peralatan seperti inkubator, pipet, dan mikrotom harus berfungsi dengan baik dan dikalibrasi secara teratur untuk memastikan konsistensi dan akurasi hasil.

MARKER IMUNOHISTOKIMIA UTAMA DALAM KANKER PAYUDARA

Marker molekuler pada kanker payudara adalah biomolekul yang diekspresikan dalam sel kanker payudara dan dapat digunakan untuk diagnosis, prognosis, serta pemilihan terapi yang tepat. Pemahaman mengenai marker ini sangat penting dalam manajemen klinis kanker payudara karena

membantu dalam menentukan karakteristik tumor, mengidentifikasi subtype kanker, dan merancang strategi pengobatan yang lebih efektif. Berikut adalah beberapa marker molekuler utama yang sering dianalisis dalam konteks kanker payudara:

ER (Estrogen Receptor)

Reseptor estrogen adalah protein yang memungkinkan sel kanker payudara untuk merespons estrogen, hormon yang dapat memicu pertumbuhan sel kanker. Sekitar 70-80% kanker payudara adalah ER-positif.³³ Analisis ekspresi ER sangat penting karena:

- Prognosis: Kanker payudara ER-positif cenderung memiliki prognosis yang lebih baik dibandingkan dengan kanker yang ER-negatif.³⁴
- Terapi: Kanker ER-positif sering merespon terhadap terapi hormon seperti tamoksifen atau inhibitor aromatase, yang menghambat aksi estrogen pada sel kanker.³⁵

PR (Progesterone Receptor)

Reseptor progesteron adalah marker lain yang sering diekspresikan bersama dengan ER. Seperti ER, PR juga terlibat dalam respons sel kanker terhadap hormon progesteron.³⁶ Analisis PR memiliki beberapa implikasi klinis:

- Prognosis: Kehadiran PR, bersama dengan ER, biasanya menunjukkan tumor yang lebih hormon-sensitif dan prognosis yang lebih baik.³⁷
- Terapi: Tumor yang PR-positif cenderung lebih responsif terhadap terapi hormon.³⁸

HER2/neu

HER2 adalah protein yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan dan proliferasi sel. Sekitar 15-20% kanker payudara menunjukkan overekspresi HER2, yang dikaitkan dengan agresivitas tumor yang lebih tinggi.³⁹ Deteksi HER2 penting karena:

- Prognosis: Kanker yang HER2-positif cenderung lebih agresif dan memiliki prognosis yang lebih buruk.⁴⁰
- Terapi: HER2-positif biasanya merespon terhadap terapi yang menargetkan HER2, seperti trastuzumab (Herceptin) dan pertuzumab. Terapi ini dapat secara signifikan meningkatkan hasil klinis.⁴¹

Ki-67

Ki-67 adalah marker proliferasi yang menunjukkan seberapa cepat sel-sel tumor membelah.⁴² Tingkat ekspresi Ki-67 dapat digunakan untuk menilai:

- Prognosis: Tingkat Ki-67 yang tinggi biasanya terkait dengan tumor yang lebih agresif dan prognosis yang lebih buruk.⁴³
- Pemilihan Terapi: Informasi mengenai tingkat proliferasi dapat membantu dalam memilih strategi terapi yang lebih agresif atau konservatif.⁴⁴

p53, E-Cadherin, dan marker lainnya

p53 adalah protein supresor tumor yang berfungsi dalam pengaturan siklus sel dan apoptosis. Mutasi pada gen p53 sering ditemukan pada berbagai jenis kanker, termasuk kanker payudara. Analisis p53 memberikan informasi mengenai:

- Prognosis: Mutasi atau disfungsi p53 biasanya terkait dengan tumor yang lebih agresif dan prognosis yang lebih buruk.⁴⁵
- Resistensi Terapi: Mutasi p53 dapat mempengaruhi respons terhadap terapi tertentu, termasuk kemoterapi.⁴⁶

E-cadherin adalah protein adhesi sel yang penting untuk menjaga struktur jaringan. Kehilangan atau penurunan ekspresi E-cadherin sering dikaitkan dengan karsinoma lobular invasif:

- Diagnostik: Kehadiran atau ketiadaan E-cadherin membantu dalam membedakan antara karsinoma lobular dan duktal.
- Prognosis: Kehilangan E-cadherin biasanya dikaitkan dengan sifat invasif yang lebih tinggi dari tumor.^{45,47}

Selain marker yang disebutkan di atas, ada sejumlah marker molekuler lainnya yang terus diteliti untuk peran mereka dalam kanker payudara, termasuk BRCA1 dan BRCA2 (terkait dengan kanker payudara hereditas), PD-L1 (terkait dengan imunoterapi), dan banyak lainnya.

Marker molekuler ini memainkan peran penting dalam personalisasi terapi kanker payudara, memungkinkan pendekatan yang lebih tepat dan efektif dalam pengelolaan penyakit ini. Analisis marker ini melalui teknik imunohistokimia dan metode molekuler lainnya memberikan informasi kritis untuk pembuatan keputusan klinis yang lebih baik.

PENGARUH HASIL IMUNOHISTOKIMIA TERHADAP PILIHAN TERAPI

Hasil imunohistokimia (IHK) memainkan peran penting dalam menentukan pilihan terapi untuk pasien kanker payudara. Dengan mengidentifikasi ekspresi protein tertentu dalam jaringan tumor, IHK membantu ahli patologi dan onkolog dalam merumuskan strategi pengobatan yang lebih tepat dan personalisasi. Berikut adalah beberapa cara di

mana hasil IHK mempengaruhi keputusan terapi:

Estrogen Receptor (ER) dan Progesterone Receptor (PR)

Tumor yang positif untuk reseptor estrogen (ER+) dan/atau progesteron (PR+) biasanya lebih responsif terhadap terapi hormon. Terapi ini melibatkan penggunaan agen seperti tamoxifen atau aromatase inhibitor untuk menghambat efek hormon estrogen pada pertumbuhan sel kanker. Identifikasi status ER dan PR melalui IHK memungkinkan dokter untuk mempertimbangkan terapi hormon sebagai bagian dari rencana pengobatan, yang dapat mengurangi risiko kekambuhan dan meningkatkan kelangsungan hidup pasien.^{35,36}

Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2/neu)

Sekitar 20% kanker payudara menunjukkan overekspresi HER2/neu. Tumor HER2-positif cenderung lebih agresif tetapi dapat diobati dengan terapi yang ditargetkan seperti trastuzumab (Herceptin), pertuzumab, atau lapatinib. Uji IHK yang menunjukkan overekspresi HER2/neu akan mengarahkan dokter untuk menggunakan terapi target anti-HER2, yang dapat secara signifikan meningkatkan hasil klinis.⁴⁸

Proliferasi Sel (Ki-67)

Ki-67 adalah marker proliferasi sel yang diukur untuk menilai tingkat pertumbuhan tumor. Tingginya ekspresi Ki-67 menunjukkan bahwa sel-sel kanker membelah dengan cepat, yang biasanya dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk. Informasi tentang tingkat proliferasi sel dapat membantu dalam memilih regimen kemoterapi yang lebih agresif untuk menangani tumor dengan pertumbuhan cepat.^{23,32,44}

p53, EGFR, dan lainnya

Marker lain seperti p53 (*tumor suppressor protein*) dan EGFR (*epidermal growth factor receptor*) juga dapat dianalisis melalui IHK untuk memberikan informasi tambahan tentang karakteristik biologis tumor. Analisis ini dapat membantu dalam menilai prognosis dan memilih terapi yang sesuai, misalnya, tumor dengan mutasi p53 mungkin memiliki prognosis yang lebih buruk dan memerlukan pendekatan terapi yang lebih intensif.^{45,46}

PERKEMBANGAN TERKINI IHK

Imunohistokimia (IHK) telah berkembang pesat dengan berbagai teknologi baru

yang meningkatkan akurasi, efisiensi, dan kedalaman analisis. Berikut adalah beberapa teknologi baru dalam imunohistokimia yang memiliki potensi besar untuk meningkatkan diagnosis dan pengobatan kanker:

Multiplex Immunohistochemistry/Immunofluorescence

Multiplex IHK/Immunofluorescence memungkinkan deteksi simultan beberapa biomarker dalam satu sampel jaringan. Teknologi ini memanfaatkan pewarnaan dengan beberapa antibodi yang diberi label fluoresen atau enzimatis berbeda.⁴⁹ Keuntungan utama adalah:

- Dapat mendeteksi beberapa target molekuler dalam satu irisan jaringan, memberikan gambaran lebih komprehensif tentang mikrolingkungan tumor.
- Memungkinkan studi hubungan spasial antara berbagai jenis sel dan protein dalam jaringan tumor.

Automated Image Analysis and Artificial Intelligence (AI)

Analisis Gambar Otomatis dan AI telah membawa perubahan signifikan dalam interpretasi hasil imunohistokimia.⁵⁰ Beberapa manfaat utama termasuk:

- Kuantifikasi Akurat: Menggunakan perangkat lunak untuk mengkuantifikasi ekspresi biomarker secara objektif, mengurangi variabilitas antar-pemeriksa.
- Pengenalan Pola: AI dapat dilatih untuk mengenali pola yang kompleks dalam jaringan, yang mungkin terlewatkan oleh mata manusia.
- Efisiensi Waktu: Mempercepat proses analisis, memungkinkan penilaian hasil yang lebih cepat.^{51,52}

Digital Pathology

Patologi Digital melibatkan pemindaian dan digitalisasi slide histologi. Ini memungkinkan patologi untuk menganalisis sampel secara digital dan menawarkan beberapa keunggulan:

- Kolaborasi Jarak Jauh: Slide digital dapat dengan mudah dibagikan dan dianalisis oleh ahli patologi di lokasi yang berbeda.
- Penyimpanan dan Pengelolaan Data: Slide digital dapat disimpan dalam database yang terorganisir dengan baik, memfasilitasi pencarian dan pengambilan data.⁵³

Advanced Chromogenic Detection Systems

Sistem Deteksi Kromogenik Lanjutan telah meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi biomarker. Beberapa sistem baru

menggunakan kromogen dengan kontras warna tinggi yang membuat hasil lebih mudah dibaca dan diinterpretasikan.⁵⁴

Spatial Transcriptomics

Spatial Transcriptomics menggabungkan data genetik dengan informasi spasial dari sampel jaringan.⁵⁵ Ini memungkinkan para peneliti untuk memahami bagaimana ekspresi gen berbeda dalam konteks mikrolingkungan jaringan:

- a. Resolusi Tinggi: Mengidentifikasi ekspresi gen pada tingkat sel tunggal sambil mempertahankan lokasi sel dalam jaringan.
- b. Integrasi dengan IHK: Dapat digunakan bersamaan dengan imunohistokimia untuk korelasi antara ekspresi protein dan RNA.⁵⁶

Digital Slide Scanners and High-Resolution Imaging

Pemetaan Digital dan Pemindaian Resolusi Tinggi memungkinkan pencitraan jaringan dengan detail yang sangat tinggi. Teknologi ini mencakup:

- a. Resolusi Nano: Pemindaian dengan resolusi sangat tinggi yang memungkinkan visualisasi struktur subselular.
- b. Pemindaian Cepat: Sistem yang dapat memindai ratusan slide dalam waktu singkat, meningkatkan throughput laboratorium.⁵⁷

Nanotechnology-based Immunohistochemistry

Nanoteknologi dalam IHK menggunakan nanopartikel yang dilabeli dengan antibodi untuk meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi biomarker. Keunggulannya meliputi:

- a. Peningkatan Sensitivitas: Nanopartikel dapat memperkuat sinyal deteksi, memungkinkan deteksi biomarker dengan konsentrasi rendah.
- b. Multifunctional Nanoprobes: Nanopartikel dapat dirancang untuk mendeteksi beberapa target sekaligus, mirip dengan multiplexing.⁵⁸

DAFTAR PUSTAKA

1. 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.
2. Ramos A. Chapter 5 Principles and Methods of Immunohistochemistry. 691:83–96.
3. Herrera-arias OS, Díaz-cardona J. Inmunohistoquímica en patología de mama. Diferenciación de lesiones complejas benignas y malignas de mama : un reporte de caso y revisión de la literatura *Immunohistochemistry in breast pathology. Differentiating complex benign and malign breast lesions : a case report and literature review*. 2011;62(3):267–71.
4. Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. *Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology*. 2018;
5. Hofman FM, Taylor CR. *Immunohistochemistry*. In: *microscopy*. 2013. p. 1–26.
6. 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.
7. C. Bordea, A. Blidaru, I. Condrea AP. *Clinical e pathological findings of sentinel lymph node invasion in breast cancer*. In 2014. p. 2014.
8. Vancurova I, Zhu Y. *Immune Mediators in Cancer*. UK: Humana Press; 2020. 152 p.
9. 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.
10. Plante I, Stewart MKG, Laird DW. *Evaluation of Mammary Gland Development and Function in Mouse Models*. 2016;(July 2011).
11. Pugalendhi P, Manoharan S, Baskaran N. *Effects of genistein and daidzein, in combination, on immunoexpression pattern of ER, PR and HER-2/neu during 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinogenesis in rats*. *Int J Res Pharm Sci*. 2010;1(4):421–7.
12. Ara JARA. *Technical Aspects of Immunohistochemistry*. 2005;426:405–26.
13. Shi S rong, Shi Y, Taylor CR. *Antigen Retrieval Immunohistochemistry : Review and Future Prospects in Research and Diagnosis over Two Decades*. 2011;
14. Kalra L. *Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Tissues : An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections*. 1991;
15. Hawes D, David S rong SHI, Taylor CR, Cote RJ. *Immunohistochemistry*. 2020;(January).
16. Polak JM VNS. *Introduction to Immunocytochemistry 3rd ed*. oxford, editor. UK: Scientific Publishers Ltd; 2003.
17. Shojaeian, S., Maslehat Lay, N., & Zarnani

- AH. Detection Systems in Immunohistochemistry [Internet]. IntechOpen. Available from: doi: 10.5772/intechopen.82072
18. Faizal M, Fauzi A, Siti W, Munirah H, Ahmad W, Jamaluddin MF, *et al.* Allred Scoring of ER-IHC Stained Whole-Slide Images for Hormone Receptor Status in Breast Carcinoma. 2022;1–17.
 19. Rusdi NK. Potensi ekstrak tertarget lunasin pada penghambatan karsinogenesis kanker payudara tikus sprague dawley yang diinduksi DMBA. Universitas Indonesia; 2022.
 20. 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 non-small cell lung cancer. 2017;912–20.
 21. Ma H, Lu Y, Marchbanks PA, Folger SG, Strom BL, McDonald JA, *et al.* Quantitative measures of estrogen receptor expression in relation to breast cancer-specific mortality risk among white women and black women. 2013;15(5):1.
 22. 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.
 23. Bzorek M. Perspectives From the NordiQC Proficiency Testing Program. 2023;31(7):452–8.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Wednesday , 16 April 2008 Poster Sessions. 2008;(April):2008.
 27. 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.
 28. 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.
 30. 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. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1742-1>
 31. Can W, Wrong G. Diagnostic Immunohistochemistry. 2016;140(September).
 32. 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.
 33. Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview. J Intern Med. 1999 Aug;246(2):133–8.
 34. Haines CN, Wardell SE, McDonnell DP. Current and emerging estrogen receptor-targeted therapies for the treatment of breast cancer. Essays Biochem. 2021 Dec;65(6):985–1001.
 35. Chen P, Li B, Ou-Yang L. Role of estrogen receptors in health and disease. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:839005.
 36. Jorns JM. Breast Cancer Biomarkers: Challenges in Routine Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and HER2/neu Evaluation. Arch Pathol Lab Med. 2019 Dec;143(12):1444–9.
 37. Horwitz KB, Sartorius CA. 90 years of progesterone: Progesterone and progesterone receptors in breast cancer: past, present, future. J Mol Endocrinol. 2020 Jul;65(1):T49–63.
 38. Li Z, Wei H, Li S, Wu P, Mao X. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. Drug Des Devel Ther. 2022;16:305–14.
 39. Killelea BK, Chagpar AB, Bishop J, Horowitz NR, Christy C, Tsangaris T, *et al.* Is there a correlation between breast cancer molecular subtype using receptors as surrogates and mammographic appearance? Ann Surg Oncol. 2013 Oct;20(10):3247–53.
 40. Baselga J, Lewis Phillips GD, Verma S, Ro J, Huober J, Guardino AE, *et al.* Relationship between Tumor Biomarkers and Efficacy in EMILIA, a Phase III Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res. 2016 Aug;22(15):3755–63.
 41. Pegram MD, Pauletti G, Slamon DJ. HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. Breast Cancer Res Treat. 1998;52(1–3):65–77.

42. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S67-72.
43. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, *et al.* Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Jul;113(7):808–19.
44. Nielsen TO, Leung SCY, Riaz N, Mulligan AM, Kos Z, Bane A, *et al.* Ki67 assessment protocol as an integral biomarker for avoiding radiotherapy in the LUMINA breast cancer trial. *Histopathology*. 2023 Dec;83(6):903–11.
45. Derksen PWB, Braumuller TM, van der Burg E, Hornsveld M, Mesman E, Wesseling J, *et al.* Mammary-specific inactivation of E-cadherin and p53 impairs functional gland development and leads to pleomorphic invasive lobular carcinoma in mice. *Dis Model Mech*. 2011 May;4(3):347–58.
46. Maru D, Middleton LP, Wang S, Valero V, Sahin A. HER-2/neu and p53 overexpression as biomarkers of breast carcinoma in women age 30 years and younger. *Cancer*. 2005 Mar;103(5):900–5.
47. Singhai R, Patil VW, Jaiswal SR, Patil SD, Tayade MB, Patil A V. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *N Am J Med Sci*. 2011 May;3(5):227–33.
48. Mouttet D, Laé M, Caly M, Gentien D, Carpentier S, Peyro-Saint-Paul H, *et al.* Estrogen-Receptor, Progesterone-Receptor and HER2 Status Determination in Invasive Breast Cancer. Concordance between Immuno-Histochemistry and MapQuant™ Microarray Based Assay. *PLoS One*. 2016;11(2):e0146474.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Kayser K, Görtler J, Bogovac M, Bogovac A. AI (artificial intelligence) in histopathology – from image analysis to automated diagnosis. 2009;(January).
53. 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.
54. Tsutsumi Y. Pitfalls and Caveats in Applying Chromogenic Immunostaining to Histopathological Diagnosis. 2021;1–57.
55. Yu Q, Jiang M, Wu L. Spatial transcriptomics technology in cancer research. 2022;(October):1–18.
56. 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.
57. Duenweg SR, Bobholz SA, Lowman AK, Stebbins MA, Winiarz A, Nath B, *et al.* Whole slide imaging (WSI) scanner differences in fluorescence optical and computed properties of digitized prostate cancer histology. *J Pathol Inform [Internet]*. 2023;14(March):100321. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpi.2023.100321>
58. 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. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06876-y>