

Media Medika Muda

Copyright©2016 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 1, Nomor 3

ISSN 1858-3318

September – Desember 2016

ARTIKEL ASLI



KOMPARASI HASIL IMUNOSENSOR PENDETEKSI EKSPRESI ECD-HER2 DENGAN HASIL PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA HER2 PADA KARSINOMA PAYUDARA

Eka Yudhanto

*A COMPARISON BETWEEN IMMUNOSENSORY DETECTING ECD-HER2 EXPRESSION
AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY EXAMINATION HER2 IN BREAST CARCINOMA*

ABSTRACT

Background: The era of molecular biology has enabled us to have an in-depth study on cellular living process, including malignancy process. In breast cancer one of the genes widely studied is HER2 where the expression of which influences the critical prognosis of the patient. Today the gold-standard of HER2 detection using immunohistochemistry-based method. This method requires laboratory and experts with special qualification, but unfortunately not many are available in our country. The result also allows subjective interpretation. On the other hand, the immunosensor as a preliminary step to create immunosensor for detecting ECD-HER2 expression.

Methods: Thirty one patients undergo blood test with immunosensor method. Five patients haven't histopathologic result, and 3 patients didn't continue immunohistochemistry, as a reference, were measured with immunosensor method as compared. T-test analysis was performed with SPSS ver 12.0 for windows program.

Results: Patients with positive result from IHC have trend to lower charge density with cut off point 6.99 volt ($p < 0.05$). This condition build up hypothesis "when antigen doesn't meet a compatible antibody, it has higher charge density state than antigen meet with a compatible antibody".

Conclusion: Immunosensor test is possibly a promising tool for detecting antibody-antigen reaction by differentiation of its charge density.

Keywords: HER2, ECD-HER2, immunohistochemistry, immunosensor, charge density.

ABSTRAK

Latar belakang: Era biologi molekuler telah membawa kita memperdalam berbagai proses kehidupan di tingkat seluler termasuk di dalamnya adalah proses keganasan. Pada kanker payudara salah satu gen yang banyak diteliti adalah HER2 yang ekspresinya diyakini ikut mempengaruhi prognosis klinis penderita. Saat ini baku emas cara pendeteksian ekspresi HER2 adalah dengan metode berbasis imunohistokimia. Metode ini memerlukan laboratorium dan ahli dengan kualifikasi khusus yang tidak banyak terdapat di negara kita. Hasil pemeriksaannya pun memiliki unsur subyektif. Di lain pihak metode immunosensor makin dikembangkan sebagai cara alternatif untuk menilai proses interaksi antigen-antibodi secara cepat, mudah, dengan hasil interpretasi yang obyektif. Penelitian ini dimaksudkan untuk menggali potensi immunosensor sebagai langkah awal untuk menciptakan immunosensor pendeteksi ekspresi ECD-HER2.

Metode: Sebanyak 31 pasien menjalani tes darah dengan metoda immunosensor. Lima pasien tidak ditemukan hasil pemeriksaan histopatologinya, dan 3 pasien tidak melanjutkan pemeriksaan imunohistokimia (IHC), sehingga 8 pasien dieklusi. Dua puluh tiga sampel tumor dilakukan pemeriksaan IHC. Delapan pasien hasilnya positif dan 15 pasien negatif. Penelitian ini bersifat eksplorasi-deduktif. Hasil IHC HER2 dipakai sebagai referensi, yang kemudian dikomparasi dengan metoda immunosensor. Analisis dilakukan dengan *t-test* dengan program SPSS ver 12.0.

Hasil: Pasien dengan IHC positif memiliki trend densitas muatan (*charge density*) yang lebih rendah dengan titik potong (*cut off point*) 6,99 volt ($p < 0,05$). Kondisi ini membangun hipotesis "jika antigen tidak bertemu dengan antibodi yang sesuai, antigen berada dalam keadaan densitas muatan yang lebih tinggi dibanding jika antigen bertemu dengan antibodi yang sesuai".

Simpulan: Tes imunosensor bisa menjadi alat yang menjanjikan dalam mendeteksi reaksi antibodi-antigen berdasar perbedaan densitas muatannya.

Kata kunci : HER2, ECD-HER2, imunohistokimia, imunosensor, densitas muatan.

PENDAHULUAN

Pada kanker payudara, salah satu gen yang banyak diteliti adalah HER2 yang ekspresinya meningkat (overekspresi) pada sebagian kasus kanker payudara.¹⁻⁵ Overekspresi HER2 ini menjadi faktor prediktif dan ikut bertanggung jawab terhadap prognosis penderita.⁴⁻⁶

Saat ini baku emas cara pendeteksian overekspresi HER2 adalah dengan berbagai metode berbasis imunohistokimia yang akan memberikan nilai semi kuantitatif terhadap ekspresi gen ini.^{1,7,8} Walau banyak jenisnya, berbagai metode pemeriksaan overekspresi HER2 masih memiliki beberapa kelemahan, seperti hanya dapat dilakukan pada laboratorium yang telah dipersiapkan khusus baik sarana maupun ahlinya, sehingga tidak banyak menjangkau penderita di daerah pelosok. Selain itu biaya pemeriksaan relatif mahal dan hasilnya mengandung unsur interpretasi yang subjektif.^{7,8,9}

Di lain pihak, kini dikembangkan suatu metode yang dinamakan biosensor. Metode ini makin luas digunakan untuk mendeteksi segala sesuatu hal yang berhubungan dengan aktifitas biologis makhluk hidup termasuk manusia hingga ke tingkat molekuler.^{10,11} Biosensor untuk menilai proses antigen-antibodi disebut imunosensor.¹⁰⁻¹³

Secara umum metode imunosensor sendiri menjanjikan beberapa kelebihan dibanding metode konvensional seperti.^{10,12,13}

- Mudah digunakan; karena alatnya mudah dibawa ke mana saja (*portable*).
- Obyektif; karena didisain secara elektrik maka hasilnya cukup obyektif dengan nilai semikuantitatif atau bahkan kuantitatif.
- Spesifisitasnya tinggi; karena hanya bereaksi terhadap biomolekul tertentu.
- Real time.
- Relatif murah; proses pemeriksaannya sederhana dan cepat, bila alat ini mampu digunakan lebih dari satu kali tanpa ada reagen atau bahan khusus habis pakai (*multiple use and undisposable device*).

Dari berbagai tipe imunosensor yang ada,

penulis mencoba mengembangkan metode imunosensor potensiometrik jenis imunosensor potensial membran dengan dasar penelitian yang telah penulis lakukan sebelumnya untuk mendeteksi ekspresi HER2.¹⁴ Karena kesesuaian spesifikasi molekulernya dengan rhu-Mab HER2 maka dalam penelitian ini biomolekul yang dipakai adalah antibodi monoklonal RTU-CBE-356 buatan Novo-Castra, Inggris.^{11,15} Demikian pula alginat yang berasal dari skeleton ganggang laut memiliki sifat-sifat fisis dan kimiawi sebagai polimer yang cukup kuat dan fleksibel dipilih sebagai media peng-catching biomolekul.¹⁶⁻¹⁹ Alginat sendiri murah dan banyak tersedia di pasaran.

TUJUAN

Mengeksplorasi kemampuan imunosensor dalam mendeteksi reaksi antigen-antibodi dalam darah.

Melakukan komparasi nilai-nilai ekspresi ECD-HER2 dalam darah dengan metode imunosensor yang dibandingkan dengan baku emas pemeriksaan imunohistokimia HER2.

Pengembangan imunosensor diharapkan dapat memperkaya khazanah sarana diagnostik yang dapat digunakan oleh dokter untuk mengetahui perannya dalam kapasitas mendeteksi reaksi antigen-antibodi, khususnya overekspresi ECD-HER2 dalam darah. Hal ini nantinya diharapkan dapat memberikan arahan terapi yang tepat sekaligus memberikan gambaran prognosis bagi penderita kanker payudara. Bagi pasien sendiri diharapkan penyakitnya dapat dipantau secara cepat dan berkesinambungan.

METODE

Penelitian ini untuk mengetahui perbandingan antara besaran arus listrik dengan hasil pewarnaan dari suatu reaksi antibodi-antigen.

Sebagai pembuktian, yaitu dengan menjawabnya langsung dari hasil percobaan dan kemudian membandingkannya dengan baku emas

Tabel 1. Daftar pasien berikut hasil pemeriksaan imunohistokimia

No.	Inisial nama	No RM	No PA	Hasil IHC	
1	Aal	3106892	0702906 / 0703018	(+) 20%	Negatif
2	Aje	3069820	0703073	0	Negatif
3	Ami	3002151	0603381	(++) 25%	Negatif
4	Amil	3102417	0702527	(+) 40%	Negatif
5	As	3080940	0700029	No data	-
6	Bon	3108653	0703578	0	Negatif
7	En	3083840	0604862	(+++) 50%	Positif
8	Ev	3106453	0702946	No data	-
9	Ha	3066059	0606814	No data	-
10	Kas	3080940	0700377	No data	-
11	Mai	3107503	0703658	(+) 25%	Negatif
12	Mar	3066526	0601318	(+) 30%	Negatif
13	Neng	2947461	0604826	No data	-
14	Nung	3087086	0700800	0	Negatif
15	Re	3081389	0607984	(+++) 70%	Positif
16	Ria	3066513	0607325	0	Negatif
17	Rim	3100321	-	Drop out	-
18	Rob	3060757	0607837	(+++) 30%	Positif
19	Ruk	3063593	0606103	(+++) 60%	Positif
20	Sara	3089468	0700080	(+++) 40%	Positif
21	Sarn	3065139	0606786	0	Negatif
22	StF	3043217	0603766	(+++) 40%	Positif
23	StH	3064622	0703252	0	Negatif
24	StM	590005	0702510	(+++) 70%	Positif
25	Sri	3083985	0700356	0	Negatif
26	Sya	3064809	0700740	(+++) 70%	Positif
27	Tau	3109709	-	Drop out	-
28	Tum	3041273	0606238	0	Negatif
29	Yuni	3002071	HAG 024 / 07	(++) 70%	Negatif
30	Yunt	2989856	0602572	(+) 10%	Negatif
31	Vei	3107050	-	Drop out	-

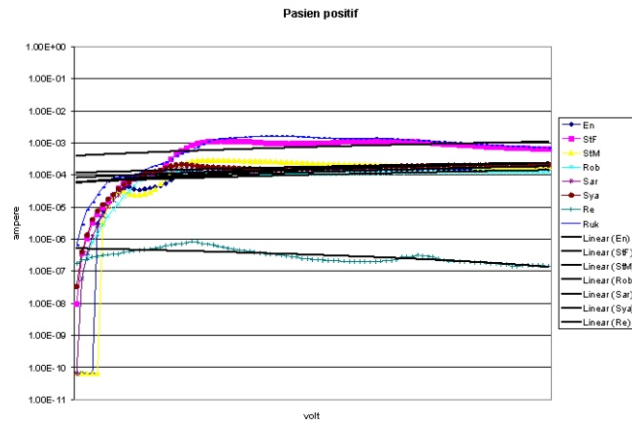
*) bermakna secara statistik

(gold standard) untuk melihat estimasi yang ditimbulkan.²⁰

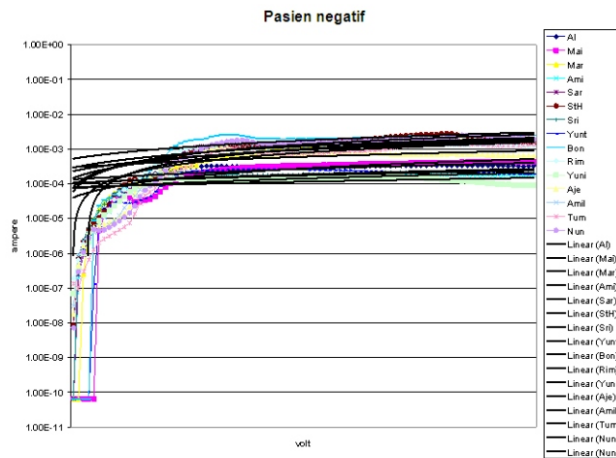
Karena penelitian ini untuk membangun model purwarupa (*prototype*) yang hasilnya bersifat pembuktian langsung berulang maka tidak ditentukan besar sampel minimal. Meski demikian semakin banyak sampel akan semakin kuat

reliabilitas (*reliability*) dan reproduibilitasnya (*reproducibility*). Sehingga jumlah sampel berdasar pasien yang datang untuk diperiksa (*consecutive sampling*).

Kriteria inklusi yang dipakai adalah semua pasien tumor ganas payudara segala stadium yang telah dibuktikan secara pemeriksaan histopatologis



Gambar 1. Grafik logaritma dan kecenderungan (*trend-linear*) pasien HER2 positif



Gambar 2. Grafik logaritma dan kecenderungan (*trend-linear*) pasien HER2 negatif

dan imunohistokimia HER2 dari jaringan tumornya.

Sedangkan kriteria eksklusinya adalah bila hasil pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia dinyatakan rusak oleh ahli patologi anatomi.

Variabel bebas yang ditentukan adalah darah perifer pasien dan jaringan tumor ganas payudara pasien yang sama. Sedangkan variabel tergantung berupa hasil pengukuran besaran arus listrik dan pewarnaan imunohistokimia jaringan tumor ganas payudara dari masing-masing pasien.

Alat yang dipakai : Sput 1 ml, potensiometrik terkalibrasi. Kemudian elektroda yang tertanam pada polimer alginat yang dibuat penulis beserta tim di ITB Bandung.¹⁴

Sedangkan bahan yang dipakai berupa antibodi

monoklonal RTU-CBE-356 buatan Novo Castra-Inggris dan Natrium-alginat buatan PT Bratachem-Indonesia. Kemudian contoh darah sebanyak 0,1 ml dari para pasien yang masuk kriteria inklusi di bagian bedah tumor RSUPN Cipto Mangunkusumo Jakarta.

HASIL

Selama penelitian terkumpul 31 pasien yang pada perjalanannya tereklusi 8 orang, dengan perincian 3 orang tidak meneruskan pemeriksaan imunohistokimia dan 5 orang tidak diketemukan hasil pemeriksaan imunohistokimianya (Tabel 1).

Hasil positif ditemukan sejumlah 8 dari 23 pasien, yang artinya ditemukan pada $8/23 \times 100\% = 34,78\%$. Hal ini nampak lebih tinggi dibanding

literatur yang menyatakan rentang positif berkisar 10-30%.^{1-3,21,22,23,24}

Pada sejumlah pasien dengan HER2 positif dan negatif, hasil logaritma dan kecenderungannya (*trend-linear*) dengan tes immunosensor tampak pada gambar 1 dan 2.

Hasil grafik logaritma dan *trend-linear* menunjukkan bahwa pasien positif HER2 lebih berkumpul pada rentang arus log 1/10⁴ ampere (gambar 1).

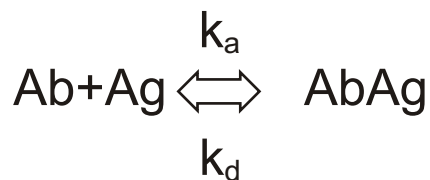
Hasil grafik logaritma dan *trend-linear* menunjukkan bahwa pasien negatif HER2 lebih berkumpul pada rentang arus log 1/10³ ampere (gambar 2). Hasil ini menunjukkan sekitar 10x lebih kuat densitas muatan yang terjadi pada pasien negatif HER2 dibanding pasien positif HER2.

DISKUSI

Interpretasi hasil imunohistokimia HER2 bersandar pada reaksi kromogenik antara ikatan antibodi antigen yang didapat dari tingkat kepositifan (0,+1,+2,+3) dan prosentase jumlah sel yang terwarnai. Ikatan antibodi yang divisualisasikan ini hasilnya dilihat dengan mikroskop cahaya.^{1,25}

Dari hasil pemeriksaan maka dikelompokkanlah hasil immunosensor sesuai dengan hasil pemeriksaan imunohistokimia sebagai baku emasnya.

Seperti telah diuraikan di atas, bahwa ikatan antigen dan antibodi mengandung ekuilibrium tertentu yang menentukan apakah terjadi asosiasi atau disosiasi antar molekul.



Dalam solusio, proses asosiasi dan disosiasi berlangsung relatif cepat. Laju asosiasi merupakan proses pengikatan (pembentukan kompleks AbAg), sedangkan disosiasi adalah proses pemutusan ikatan antibodi-antigen (penguraian kompleks AbAg). Jadi afinitas yang tinggi dari antibodi-antigen membutuhkan k_d yang rendah (k_a yang tinggi) dan sebaliknya.¹²

Reaksi kopling antibodi antigen mempunyai besaran muatan listrik tertentu.¹¹ Pada teknologi immunosensor yang digandengkan dengan teknologi semikonduktor, proses pendeteksian yang digunakan diantaranya dengan mengukur perubahan konstanta dielektrik yang ditimbulkan akibat transfer elektron akibat reaksi kopling antibodi-antigen tersebut.^{11,13}

Dari hasil pengukuran metode immunosensor didapatkan pada kondisi HER2 positif bila diberikan antibodi yang sesuai maka akan terjadi ikatan antibodi-antigen, akan mengakibatkan kecenderungan densitas muatan (*charge density*) yang lebih rendah dibanding bila tidak terjadi ikatan. Patut diduga kecenderungan ini membangun hipotesis bahwa k_d yang tinggi pada keadaan antibodi dan antigen terpisah karena densiti muatan masih tinggi, sehingga menimbulkan arus listrik yang lebih besar. Arus listrik sendiri merupakan hasil penilaian densiti muatan terhadap waktu.

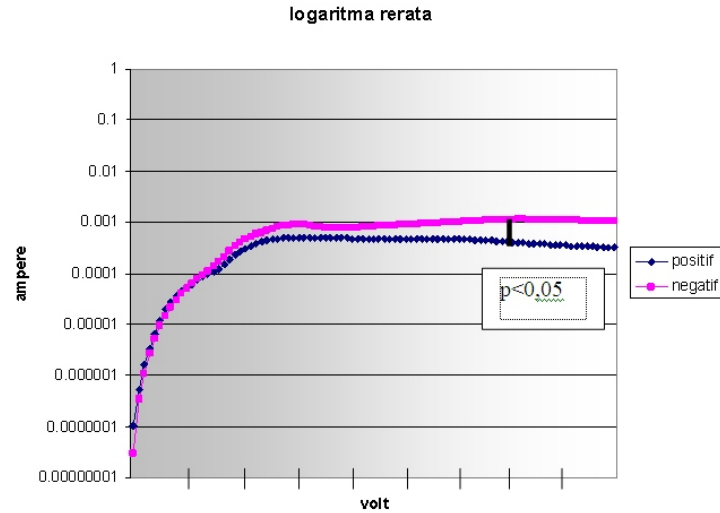
Pada keadaan antigen bertemu dengan antibodi yang sesuai maka terjadi rekombinasi antigen-antibodi. Kondisi ini ditunjukkan dengan densiti muatan (arus listrik) yang lebih rendah.

Kejadian-kejadian ini dapat dijelaskan bahwa kekuatan interaksi antibodi-antigen diukur melalui ikatan afinitas (*binding affinity*), yang merupakan hasil penjumlahan interaksi non-kovalen antara antibodi dan antigen yang terlibat dalam reaksi ikatan. Afinitas antibodi juga dinyatakan dalam konstanta asosiasi k_a seperti yang tampak pada rumus di atas.^{11,26}

Jadi bila k_a lemah yang berarti pula tak ada rekombinasi antigen-antibodi maka k_d akan tinggi. Artinya densitas muatan pada molekul-molekul tersebut tinggi. Kondisi ini terukur pada pasien negatif. Demikian sebaliknya pada kondisi pasien positif.

Bila berbagai kondisi di atas dianalisis dengan T-test, maka akan ditemukan *cut off point* 6,99 volt sebagai batas kemaknaan ($p < 0,05$) antara pasien negatif dengan pasien positif (gambar 3). Nilai *cut off point* ini didapatkan dengan cara mencari mulai dari *voltage* mana yang menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Diakui penelitian ini masih mengandung sejumlah kelemahan. Walau demikian peneliti berusaha sedapat mungkin mengatasinya dengan antibodi terstandardisasi, semua tahap



Gambar 3. Grafik logaritma gabungan pasien positif dan pasien negatif

pengambilan sampel darah dan pemeriksaan imunosenor dilakukan sendiri, alat yang selalu dikalibrasi sebelum digunakan hingga pemeriksaan imunohistokimia hanya oleh satu orang ahli.

SIMPULAN

Dari penelitian di atas maka didapatkan beberapa kesimpulan antara lain; bila terjadi ikatan antibodi-antigen akan timbul perubahan arus listrik, hipotesis bahwa kd yang tinggi akan menyebabkan densitas muatan yang tinggi pula, besaran densitas muatan ini menjanjikan kegunaan sebagai faktor pembeda ada tidaknya antigen tertentu dalam serum darah, selama diketahui pasangan antibodinya, pada penelitian ini didapatkan *cut off point* 6,99 volt sebagai batas kemaknaan antara pasien positif dan negatif.

Penulis menyarankan perlu dilakukan percobaan lebih lanjut dalam jumlah sampel lebih besar, kendali mutu yang terjaga agar reliabilitas dan reproduibilitas meningkat, penelitian juga dilakukan pada *cell line* untuk membentuk nilai standard yang lebih tepat sehingga berguna sebagai kalibrator imunosenor, menguji nilai *cut off point* sebesar 6,99 volt dalam percobaan lanjutan, sehingga batas kemaknaan dapat ditentukan dengan lebih tepat, percobaan ini setidaknya dapat membuka peluang untuk dipertimbangkan mendapat hak paten dalam kerangka prinsip dasar

imunosenor di bidang kedokteran.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anderson SM, Everett T. HER-2/neu Oncoprotein: A new target in the treatment of breast cancer. LabCorp®. [on line]: http://www.oncogene.com/technical/pdf/BC_Trtnmt.pdf.
2. Kretzchmar M. Transforming growth factor- β and breast cancer transforming growth factor- β /SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2: 107-15. [on line]: <http://www.breast-cancer-research.com/content/2/2/107>
3. Bergstein I. Molecular alterations in breast cancer. In: Bowcock AM, editor. *Breast cancer, molecular genetics, pathogenesis, and therapeutics*, 1st ed. New Jersey: Humana Press Inc., 1999: 143-70.
4. Carpenter CL, Cantley LC. Molecular targets in oncology: signal transduction systems. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Principles & practice of oncology*, 7th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publisher, 2005: 73-83.
5. Holbro T, Civenni, Hynes NE. The erbB receptors and their role in cancer progression. *Experimental Cell Research* 2003; 284: 99-110.
6. Bernstein JL, López-Carrillo L, Wang L. The epidemiology of HER2/neu and p53 in breast cancer. *Salud Publica Mex* 1999; 41 suppl 2: S114-S123.
7. Di Leo A, Dowsett M, Horten B, Penault-Llorca F. Current status of HER2 testing. *Oncology* 2002; 63 (suppl 1): 25-32.
8. van de Vijver M. Emerging technologies for HER2 testing. *Oncology* 2002; 63 (suppl 1): 33-8.
9. Michener CM, Ardekani AM, Petricoin III EF, Liotta LA, Khon EC. Genomics and proteomics: application of novel technology to early detection and prevention of cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2002; 26: 249-55.
10. Thévenot DR, Toth K, Durst RA, Wilson GS. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification

- (technical report). *Pure Appl. Chem.* 1999;71: 2333-48.
11. King DJ. Applications and engineering of monoclonal antibodies. London: Taylor & Francis Ltd, 1998: 77-118.
12. Martin JE. Composite films for modifying evanescent wave characteristics in long-period grating biosensors (thesis). Virginia: Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, USA, 2001.
13. Byfield MP, Abuknesha RA. Biochemical aspects of biosensors. *Biosensor & Bioelectronics* 1994; 9: 373-400.
14. Yudhanto E. Catching rhu-mab HER2 dalam kalsium alginat sebagai upaya pembuatan prototipe imunosensor pendeteksi HER2 (thesis). Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Indonesia, 2005.
15. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A et al. Current perspectives on HER2 testing: A review of national testing guidelines. *Mod Pathol* 2003;16(2):17382.
16. Wang NS. Enzyme immobilization protocol entrapment in alginate gel: Experiment 7B. Department of Chemical Engineering, University of Maryland, USA, 2000.
17. Cancela MA, Álvarez E, Maceiras R. Polymers in alimentary industrie: properties of the sodium alginate. Vigo: Department of Chemical Engineering, ETSEI. University of Vigo, Spain, 2001.
18. Hyun AK, Moon SS, Ji WY. Preparation and characterization of hydrophobically modified alginate. *Polymer Bulletin*, 2002;47: 429-35.
19. Hermes RS, Narayani R. Polymeric alginate films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules. *Trends Biomatrer. Artif. Organs*, 2002; 15: 54-6.
20. Hanafiah KA. Rancangan percobaan. Teori dan aplikasi. Jakarta: Penerbit Rajawali Press, 1991: 67-78.
21. Estévez LG, Seidman AD. HER2-positive breast cancer: Incidence, prognosis, and treatment options. *Am J Cancer* 2003;2 (3): 169-79.
22. Shtiegman K, Kochupurakkal BS, Ben-Basat Y, Yarden Y. Epidermal growth factor receptor in cancer: genetic aberrations and underlying signaling pathways. In: Whippen D, Foder J, Perry MC, Neuschwander J, editors. ASCO Educational Book, Alexandria: ASCO Co., 2005: 689-96.
23. Ragaz J. Impact of HER2/neu expression on natural history and outcome of human breast cancer. In: Haris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, editors. *Diseases of the breast*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, A Walter Kluwer Co., 2004: 619-52.
24. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M et al. The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. *The Oncologist* 2003; 8: 307-25.
25. Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *The Oncologist* 1998; 3: 237-52.
26. Pollard TD, Earnshaw WC. Plasma membran receptors. *Cell Biology*. Pennsylvania: Elsevier Inc., 2004: 387-400.

