

Sensitivitas dan Spesifisitas *Polymerase Chain Reaction* pada Diagnosis Her2/Neu Karsinoma Payudara Duktal Invasif

Wresnindyatsih¹, Triwani², Yuwono³, Heni Maulani³

1. Mahasiswa Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya
2. Dosen Ilmu Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran
3. Dosen Ilmu Mikrobiologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya
Jl. Dr. Moh. Ali Kompleks RSMH Palembang, Indonesia

wresnindyatsih@yahoo.co.id

Abstrak

Karsinoma payudara duktal invasif adalah keganasan yang berasal dari sel epitel pelapis duktal-lobuler payudara. Gen her2/neu merupakan salah satu gen yang mengalami amplifikasi dan menyebabkan terjadinya karsinoma payudara. Penemuan terapi target anti her2/neu menurunkan angka kematian dan memperpanjang harapan hidup penderita. Penelitian ini bertujuan memperoleh nilai sensitivitas dan spesifisitas *Polymerase Chain Reaction* diagnosis status her2/neu pada karsinoma payudara dibandingkan dengan pemeriksaan imunohistokimia. Uji diagnostik telah dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. M. Hoesin dan Balai Besar Laboratorium Kesehatan Palembang pada bulan Januari sampai November 2013. Sebanyak 39 sampel blok paraffin jaringan karsinoma payudara diambil secara purposif. Dari hasil penelitian terhadap sampel pemeriksaan imunohistokimia didapatkan hasil positif 17,94% (7 dari 39 sampel). Pemeriksaan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* didapatkan hasil positif 28,20% (11 dari 39 sampel) yang ditandai dengan adanya amplicon DNA spesifik her2/neu >2,0. Berdasarkan hasil tersebut didapatkan sensitivitas dan spesifisitas metode *Polymerase Chain Reaction* 57,14% dan 81,81% dan memiliki nilai prediksi positif dan nilai prediksi negatif 50,00% dan 85,71%. Dapat disimpulkan bahwa pemeriksaan metode *Polymerase Chain Reaction* memiliki sensitivitas lebih rendah daripada metode IHK namun spesifisitas lebih baik dibandingkan dengan metode IHK. Metode PCR dapat dikembangkan sebagai metode alternatif untuk mendiagnosis status her2/neu.

Abstract

Sensitivity and Specificity of Polymerase Chain Reaction on the Diagnosis Of Her2/Neu Invasive Duct Breast Cancer. Invasive ductal breast carcinoma is a malignancy derived from ductal-lobular unit epithelial cells lining. Her2/neu gene is one of the genes that undergo amplification and causing breast carcinoma. The discovery of anti her2/neu targeted therapy reduce mortality and prolong survival. This study aims was to determine the sensitivity and specificity of Polymerase Chain Reaction compared with immunohistochemical examination to determine the her2/neu status in breast carcinoma using her2/neu primary antibody in paraffin blocks tissue samples of breast carcinoma. Diagnostic tests have been conducted at Anatomic Pathology Laboratorium dr. M. Hoesin Hospital and the Center for Health Laboratory Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang in Januari to November 2013. There were 39 samples of breast carcinoma tissue paraffin blocks were taken purposively. This study showed positive result by immunohistochemical examination of 17.94% (7 of 39 samples). Examination by Polymerase Chain Reaction method obtained positive results 28.20% (11 of 39 samples) were characterized by the presence of specific DNA her2/neu amplicon more than 2.0. Based on the results obtained sensitivity and specificity of Polymerase Chain Reaction methods 57.14% and 81.81% and had a positive predictive value and negative predictive value of 50.00% and 85.71%. It was concluded that in this study the examination of Polymerase Chain Reaction method had lower sensitivity but the specificity was higher than immunohistochemical examination of her2/neu status. Thus, PCR method can be use as an alternative method to rule out diagnosis her2/neu status in invasive ductal breast cancer.

Keywords: Immunohistochemistry, Her2/neu, Polymerase Chain Reaction, Sensitivity, Specificity

1. Pendahuluan

Karsinoma payudara merupakan keganasan tersering pada wanita (23%) dan penyebab kematian kedua setelah kanker paru.¹ Data registrasi kanker Indonesia tahun 2009 melaporkan karsinoma payudara merupakan kanker terbanyak di Indonesia (26%) dengan kecenderungan meningkat setiap tahunnya. Salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya karsinoma payudara ini adalah amplifikasi gen her2/neu. Gen her2/neu terletak di lengan panjang kromosom 17 (17q12-21.32).² Gen ini akan mengalami overekspresi/amplifikasi pada berbagai tipe keganasan pada manusia, salah satunya adalah pada kanker payudara. Amplifikasi atau overekspresi gen her2/neu dideteksi pada 15-30% kasus karsinoma payudara.^{3,4} Overekspresi her2/neu juga merupakan faktor prediktor signifikan untuk mengetahui respon terapi.^{3,5} Pemeriksaan Imunohistokimia (IHK) merupakan pemeriksaan rutin yang direkomendasikan *Food and Drugs Administration* (FDA) untuk mengetahui overekspresi protein reseptor her2/neu pada karsinoma payudara menggunakan blok parafin tersimpan. Status her2/neu ditentukan dengan menggunakan skor Herceptest).^{5,6} Sesuai skor Herceptest skor +1 dianggap tidak terdapat overekspresi protein, sedangkan skor +2 adalah status meragukan/*equivocal*, skor +3 terjadi overekspresi her2/neu. Skor +2 dapat dilanjutkan dengan pemeriksaan tingkat DNA seperti CISH (*Chromogen In Situ Hybridization*), FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Namun metode ini sangat mahal dan memerlukan waktu cukup lama. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan suatu metode pemeriksaan DNA untuk mengetahui amplifikasi DNA gen her2/neu. Beberapa penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa sensitivitas dan spesifisitas PCR dibandingkan dengan metode IHK untuk melihat status amplifikasi gen her2/neu cukup signifikan yaitu 82% dan 80% dari 254 kasus yang diteliti).⁷ Dilaporkan penelitian yang membandingkan metode PCR dan FISH untuk mendeteksi gen

her2/neu dengan hasil kesesuaian antara FISH dan PCR adalah 92%, sedangkan adanya diskordan antara FISH dan PCR sebesar 8%.⁴ Penelitian lain juga menunjukkan bahwa metode PCR dapat digunakan untuk melihat amplifikasi gen her2/neu dengan keuntungan lebih murah, cepat dan tingkat akurasi setara metode FISH.⁸ Di Indonesia telah dilaporkan penelitian yang sama yang mendukung penelitian ini.⁹

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi negative PCR pada diagnosis her2/neu karsinoma payudara duktal invasif.

2. Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. M. Hoesin Palembang untuk pemeriksaan IHK. Pemeriksaan PCR dilakukan di Laboratorium PCR Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Palembang. Sampel penelitian berupa arsip preparat histopatologi, blok parafin dan preparat imunohistokimia her2/neu di Laboratorium Patologi Anatomi RSUP dr. M. Hoesin Palembang dari 1 Januari 2013 sampai 10 November 2013. Sebanyak 39 sampel yang diambil secara purposif dilakukan tinjau ulang preparat dan ekstraksi DNA dari blok parafin tersimpan. Tinjau ulang preparat histopatologi untuk menentukan derajat histologik berdasarkan Derajat Bloom & Richadson oleh Ellis & Elston dibagi atas derajat 1, 2 dan 3.

Teknik Imunohistokimia

Blok parafin dipotong ketebalan 3um direkatkan pada slaid poly L Lysin, lalu diletakkan pada hotplate diinkubasi semalam, dilakukan rehidrasi jaringan dan antigen retrieval. Proses IHK dengan menggunakan kit trekavidin (DAKO) dan antibodi primer her2/neu monoklonal dari DAKO (Jerman). Diagnosis her2/neu menggunakan skor Herceptest (DAKO) dikelompokkan menjadi negatif (0 dan, +1), meragukan (+2) dan positif (+3).

Teknik ekstraksi DNA

Blok parafin dipotong pita tebal 3 um sebanyak 50ug, dimasukkan ke dalam tube dan dilakukan pencucian dengan xilene 1,5ml untuk menghilangkan formalin (proses kliring) dan alkohol absolute untuk menghilangkan parafin (proses dehidrasi). Ekstraksi DNA menggunakan High Pure FFPET DNA Isolation Kit versi 0,2 Cat. No. 06 650 767 001 Roche sesuai prosedur buku manual.

Teknik PCR

Instrumen Real Time PCR menggunakan Biorad ((i Cyler iQ5TM). Primer DNA her2/neu (neu-F) 5'-gAACTggTgTATgCAgATTgC dan primer DNA reverse her2/neu (neu-R) AgC Aag AgT CCC CAT CCT A (TIB Molbiol Jerman, neu F reference no 013117473). FastStart SYBR Green master versi 09 (Roche, cat. No. 04 673 484 001, 5 ml). Masukkan ke dalam plat mikrotube 45 ul mastermix ditambahkan 5 ul ekstrak DNA sampel Untuk kontrol negatif 45 ul mastermix ditambahkan 5 ul water RNA. Plat ditutup dengan plastik perekat, dimasukkan ke dalam Real Time PCR Biorad (iQ5TM Cyler). Interpretasi nilai amplifikasi positif jika jumlah amplikon DNA >2,0 dan negatif jika jumlah amplikon ≤2.0.

Data ditabulasi dimasukkan dalam tabel 2x2 dan dilakukan perhitungan untuk mencari nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai prediksi positif dan nilai prediksi positif.

3. Hasil dan Pembahasan

A. Karakteristik Klinikohistopatologi Karsinoma Payudara Duktal Invasif

Distribusi karakteristik klinikohistopatologi pada 39 responden penderita karsinoma payudara duktal invasif berdasarkan umur, lokasi tumor, ukuran tumor, derajat histologi dan metastasis limfonodus dari data medikal dirangkum dalam Tabel 1. Usia responden antara 28-72 tahun, berdasarkan kelompok usia reproduksi yang paling banyak adalah kelompok usia 40-60 tahun sebanyak 26

responden (66,67%). Data tersebut sesuai dengan banyak rujukan yang melaporkan kasus karsinoma payudara tersering terjadi pada usia reproduktif dan perimenopause.^{1,5,9} Hal ini dihubungkan dengan status hormonal, riwayat kehamilan dan menyusui serta riwayat pemakaian kontrasepsi hormonal. Pada usia reproduksi pengaruh hormon estrogen dan progesteron untuk menyokong fungsi reproduksi sangat penting. Namun pada penelitian ini tidak didapatkan data mengenai status hormonal, riwayat kehamilan dan menyusui dan riwayat pemakaian kontrasepsi. Beberapa responden mengalami kanker payudara di usia menopause (23,70%). Hal ini dapat berhubungan dengan adanya pengaruh estrogen eksogen yang metabolismenya terjadi diluar ovarium atau adanya pengaruh terapi sulih hormon. Obesitas memicu peningkatan konsentrasi estrogen eksogen sehingga konsentrasi estrogen dalam plasma yang tinggi dapat memicu terjadinya kanker payudara.^{1,5} Adanya kasus karsinoma payudara pada usia muda di bawah 30 tahun kemungkinan karena faktor genetik yang berhubungan dengan gen BRCA1 maupun adanya mutasi kromosom 17 karena faktor lainnya seperti karsinogen, pola makan tinggi lemak hewani, kebiasaan hidup seperti merokok dan konsumsi alkohol.^{1,9} Lokasi tumor tersering adalah payudara kiri yaitu 61,54%. Kemungkinan payudara kanan merupakan payudara yang lebih fungsional pada saat pemberian ASI, sedangkan payudara kiri lebih jarang digunakan. Namun belum ada penelitian yang melaporkan hubungan ini. Ukuran tumor merupakan salah satu faktor prognosis penting yang menentukan stadium karsinoma payudara. Menurut WHO tumor yang memiliki diameter <4 sentimeter memiliki stadium lebih rendah yaitu stadium 1-2. Sedangkan diameter tumor ≥4 merupakan tumor dengan stadium tinggi yaitu 3-4, dimana biasanya massa tumor sudah sangat agresif dan mempunyai potensi metastasis. Pada penelitian ini dilaporkan responden dengan ukuran tumor ≥4 sentimeter lebih banyak terjadi (66,67%). Hal ini dapat disebabkan karena

responden terlambat memeriksakan diri dan baru berobat setelah merasakan adanya massa yang membesar dan berulkus. Nodul tumor yang kecil jarang menimbulkan nyeri dan kadang berupa penebalan saja sehingga sulit untuk mendeteksi dini. Namun saat ini dengan pemeriksaan SADARI yang dianjurkan untuk deteksi dini nodul payudara dan pemeriksaan mamografi dapat menjadi penapis tingginya insiden karsinoma payudara stadium lanjut.

Hasil penelitian ini menunjukkan responden dengan derajat histologi tumor rendah sebanyak 9 responden (23,07%) dan derajat sedang sebanyak 5 responden (12,82%). Pada penelitian ini sebagian besar responden menderita karsinoma payudara derajat tinggi yaitu 25 responden (64,10%). Derajat histologi merupakan faktor prognosis kuat untuk meramalkan prognosis penderita dimana terdapat korelasi signifikan antara derajat histologi dengan harapan hidup penderita. Hal ini berhubungan dengan sifat biologi tumor yang sangat agresif dimana secara morfologi sel neoplasia berbentuk sangat pleomorfik dan berpotensi tinggi untuk menginvasi stroma dan pembuluh limfovaskuler.^{5,10}

Tabel 1. Distribusi Karakteristik Klinikohistopatologi

Karsinoma Payudara Duktal Invasif		
Karakteristik	Jumlah sampel	Persentase (%)
Umur (n=39)		
- < 20 tahun	0	0,00
- 20 tahun-40 tahun	4	10,27
- 41 tahun-60 tahun	26	66,67
- ≥60 tahun	9	23,70
Lokasi tumor (n=39)		
- Payudara kanan	15	38,46
- Payudara kiri	24	61,54
Ukuran tumor (n=39)		
- < 4 sentimeter	13	33,40
- ≥ 4 sentimeter	26	66,67
Derajat histology (n=39)		
- Derajat 1	9	23,07
- Derajat 2	5	12,82
- Derajat 3	25	64,10
Metastasis limfonodus (n=39)		
- Positif	17	43,58
- Negatif		

Responden dengan metastasis limfonodus dilaporkan lebih banyak yaitu 22 responden (56,41%). Metastasis limfonodus merupakan faktor prognosis mayor dan prediktif yang sangat penting. Adanya metastasis ke limfonodus dilaporkan berhubungan dengan stadium klinis, tingkat harapan hidup dan tingkat kekambuhan penderita.^{1,5} Semakin banyak metastasis limfonodus yang ditemukan akan semakin buruk prognosis penderita dan semakin tinggi tingkat kekambuhan. Hal ini karena adanya metastasis limfonodus merupakan marker suatu metastasis jauh. Adanya metastasis ke organ yang jauh seperti ke otak, paru dan hati menunjukkan prognosis yang sangat buruk.¹

B. Karakteristik Hasil Pemeriksaan Her2/neu dengan Metode IHK

Hasil pemeriksaan her2/neu dengan metode IHK terhadap 39 sampel didapatkan 7 (15,38%) sampel positif, sebanyak 10 (25,64%) sampel dengan hasil meragukan dan 22 (56,41%) sampel negatif sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 5. Positivitas her2/neu pada pemeriksaan IHK dari 39 responden terdapat pada 7 responden (17,94%), her2/neu meragukan ditemukan pada 10 responden (25,64%) dan her2/neu negatif pada 22 responden (56,41%).

Tabel 2. Distribusi Ekspresi Reseptor Her2/neu berdasarkan Metode IHK

Ekspresi Reseptor Her2/neu	Jumlah sampel	Persentase (%)
Her2/neu positif (+3)	7	17,94
Her2/neu meragukan (+2)	10	25,64
Her2/neu negatif (0,+1)	22	56,41
Jumlah	39	100,00

Positivitas reseptor her2/neu berdasarkan pemeriksaan IHK dilaporkan terjadi pada 15% hingga 30% kasus karsinoma payudara.^{2,3,6} Di Indonesia positivitas reseptor her2/neu dilaporkan cukup tinggi mencapai 20%-30% dari seluruh kasus karsinoma payudara.⁹ Tahun 2012 kasus karsinoma

payudara dengan her2/neu positif mencapai 20% dari seluruh kasus karsinoma payudara.¹² Positifitas her2/neu pada pemeriksaan IHK sangat dipengaruhi oleh kualitas fiksasi jaringan tumor dan proses pembuatan preparat IHK. Fiksasi suboptimal akan menyebabkan protein jaringan rusak sehingga dapat menimbulkan hasil negatif palsu. Oleh karena itu sangat dianjurkan penggunaan fiksatif formalin buffer netral 10% dengan volume 1 berbanding 10-20 kali selama minimal 6 jam dan maksimal 72 jam. Selain itu proses jaringan yang terlalu lama di dalam alkohol membuat jaringan kering sehingga protein rusak. Pemeriksaan IHK harus memperhatikan kualitas antibodi primer dan proses *antigen retrieval*. Protein jaringan sangat dipengaruhi oleh suhu dan keasaman dimana semakin tinggi suhu dan keasaman akan merusak protein reseptor. Sedangkan proses *antigen retrieval* yang tidak sempurna (terlalu sebentar) menyebabkan ikatan metilen antara sel dan formalin tidak terbuka sehingga tidak terjadi ikatan antara reseptor her2/neu dengan antibodinya. Penyimpanan antibodi primer juga sangat menentukan, dimana antibody primer harus disimpan pada suhu di bawah +2°C untuk pemakaian jangka pendek dan di bawah 0°C untuk pemakaian jangka panjang. FDA merekomendasikan pemeriksaan lanjutan untuk status her2/neu meragukan (+2) dengan metode Hibridisasi In Situ (*In Situ Hybridization* atau ISH) dengan metode kromogen (*Chromogen In Situ Hybridization* atau CISH) maupun dengan teknik fluoresensi (*Fluorescence In Situ Hybridization* atau FISH) untuk menentukan amplifikasi DNA her2/neu. Positifitas her2/neu pada kasus yang meragukan dilaporkan hanya 10% dengan metode CISH/FISH.^{2,4}

C. Karakteristik Hasil Pemeriksaan Her2/neu dengan Metode PCR

Hasil pemeriksaan Her2/neu dengan metode Real Time Kuantifikasi (qRT PCR) pada sampel jaringan didapatkan nilai positif pada 11 (28,20%). Nilai negatif

didapatkan sebanyak 28 (71,80%) dapat dilihat pada Tabel 6.

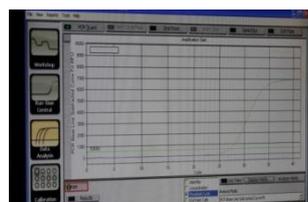
Tabel 3. Distribusi hasil pemeriksaan metode PCR

Metode PCR	Jumlah sampel	Persentase (%)
Positif (*)	11	28,20
Negatif(**)	28	71,80
Jumlah	39	100,00

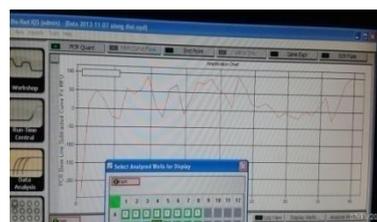
(*) : kurva sigmoid

(**) : tidak terbentuk kurva sigmoid

Positivitas sampel di atas 2,0 ditemukan pada 11 sampel, ditunjukkan sebagai kurva sigmoid yang timbul pada CT (Gambar 1) sedangkan hasil negatif ditunjukkan sebagai kurva ireguler (Gambar 2).



Gambar 1. Hasil Positif (amplifikasi $\geq 2,0$) membentuk kurva sigmoid



Gambar 2. Hasil negatif (amplifikasi $< 2,0$)

D. Hasil Uji Diagnostik PCR pada Sampel IHK Positif dan Negatif

Sebanyak 39 sampel responden dengan status her2/neu positif pada pemeriksaan IHK dilakukan pemeriksaan PCR. Hasil pemeriksaan terdapat 3 dari 7 (43%) sampel her2/neu positif pada pemeriksaan IHK terjadi amplifikasi pada pemeriksaan PCR (sampel nomer 6,63,74). Sebanyak 4 (18,18%) sampel negatif pada pemeriksaan

IHK menjadi positif pada pemeriksaan PCR (sampel nomer 30, 64, 67, 76). Sebanyak 3 (30%) dari 10 sampel responden +2 dengan pemeriksaan IHK menjadi positif dengan pemeriksaan PCR (sampel nomer 41, 72, 73).

Tabel 3. Hasil Uji Diagnostik (n= 29)

		Hasil IHK		Jumlah
		Positif	Negatif	
Hasil PCR	Positif	4	4	8
	Negatif	3	18	21
Jumlah		7	22	29

Beberapa penelitian membandingkan hasil pemeriksaan her2/neu yang menggunakan teknik IHK dan PCR telah dilakukan. Penelitian Purnomosari menyebutkan bahwa 89% skor 3+ pada pemeriksaan IHK mengalami amplifikasi dengan metode PCR, 38% skor 2+ terjadi amplifikasi pada pemeriksaan PCR, sedangkan skor 0-1 tidak terjadi amplifikasi (100%).⁹ Penelitian lain melaporkan bahwa 5 dari 6 sampel her2/neu +3 mengalami amplifikasi dengan metode PCR, sedangkan 6 sampel lainnya dengan her2/neu negatif terjadi amplifikasi dengan menggunakan metode PCR.²

Hasil uji diagnostik her2/neu terhadap 29 sampel pada pemeriksaan metode IHK yang benar-benar positif dan benar-benar negatif didapatkan 7 sampel positif dan 22 sampel negatif. Sedangkan pada pemeriksaan dengan metode PCR didapatkan 8 sampel positif dan 21 sampel negatif. Data hasil uji diagnostik pada 29 sampel tampak pada Tabel 7 di bawah ini.

Hasil uji diagnostik di atas menunjukkan bahwa sensitivitas PCR adalah 57,14%. Hasil ini lebih rendah dari penelitian sebelumnya.^{2,4,7} Rendahnya sensitivitas pada penelitian ini dibandingkan dengan penelitian lainnya dapat disebabkan beberapa faktor. Metode pemeriksaan sebelumnya kebanyakan menggunakan jaringan segar sedangkan pada penelitian ini menggunakan blok paraffin tersimpan. Faktor ekstraksi DNA sangat berpengaruh, dimana pada jaringan segar pembuatan

ekstraksi akan jauh lebih mudah dibandingkan dengan menggunakan blok paraffin. DNA dari ekstraksi blok paraffin kemungkinan sangat sedikit sehingga menjadi negatif palsu. Penyebab lain adalah kerusakan DNA pada sampel blok paraffin dapat terjadi walaupun blok paraffin yang diambil merupakan blok paraffin yang telah memenuhi kriteria inklusi. Kemungkinan lain adalah terjadi perubahan struktur basa DNA atau DNA terdegradasi karena proses fiksasi dan pembuatan blok paraffin.¹¹ Perbedaan primer DNA yang digunakan pada beberapa penelitian terdahulu telah dilaporkan dapat menghasilkan hasil negatif.^{7,9} Polisomi gen her2/neu pada kromosom 17 dapat menimbulkan nilai sensitivitas yang rendah dimana struktur DNA polisomi berbeda dengan struktur yang diteliti. Hal ini harus menjadi pertimbangan jika metode PCR akan digunakan untuk menggantikan metode IHK dalam mendiagnosis status her2/neu. Diperlukan optimalisasi dan standarisasi alat dan prosedur kerja terlebih dahulu untuk meningkatkan sensitivitas PCR. Penggunaan blok paraffin tersimpan sebagai bahan pemeriksaan PCR yang masih baru dikembangkan di beberapa penelitian masih memerlukan standarisasi prosedur kerja sehingga mendapatkan metode ekstraksi DNA yang optimal.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa spesifisitas PCR adalah 80%. Sebanyak 22 responden dengan her2/neu negatif pada pemeriksaan IHK, 18 responden diantaranya tidak mengalami amplifikasi DNA her2/neu pada pemeriksaan metode PCR. Nilai spesifisitas PCR yang cukup tinggi ini sangat penting dalam mendiagnosis status her2/neu pada karsinoma payudara. Hal ini berarti 81,81% responden dengan her2/neu negatif akan terdeteksi dengan metode PCR. Demikian juga dengan nilai duga negatif PCR sebesar 85,71% mempunyai makna penting yang berarti kemungkinan untuk mendapatkan hasil her2/neu negatif dengan PCR akan lebih besar yaitu 85,71%. Penderita dengan her2/neu negatif

mempunyai prognosis lebih baik, tingkat harapan hidup lebih tinggi dan kekambuhan lebih rendah.^{3,4,5}

Pada penelitian ini 4 dari 22 responden dengan ekspresi her2/neu negatif terjadi amplifikasi pada pemeriksaan PCR. Hal ini dapat terjadi karena beberapa faktor antara lain terjadinya kerusakan protein pada sampel blok paraffin namun tidak terjadi kerusakan DNA selnya, sehingga hasil IHK menjadi negatif palsu namun PCR positif. Protein jaringan lebih mudah mengalami kerusakan daripada DNA. Faktor lain adalah dapat terjadi kontaminasi dari sampel lain. Hal ini seharusnya tidak terjadi karena penelitian yang dilakukan sudah sesuai dengan protokol dan prosedur penelitian.

Pada penelitian ini 3 dari 10 (30%) responden dengan Her2/neu +2 (*equivocal*) mengalami amplifikasi dengan metode PCR. Hasil ini sesuai dengan penelitian Purnomosari yang melaporkan 38% her2/neu +2 terjadi amplifikasi dengan PCR. Nilai ini lebih tinggi dari penelitian lainnya yang menggunakan metode FISH yang hanya terjadi amplifikasi 10%.^{2,4} Dibandingkan dengan FISH dalam mendeteksi her2/neu +2, metode PCR jauh lebih baik. Hal ini dapat menjadi pertimbangan bahwa metode PCR dapat digunakan untuk menggantikan metode FISH dalam mendeteksi her2/neu yang *equivocal* atau meragukan. FDA merekomendasikan penderita dengan status her2/neu +2 pada pemeriksaan IHK untuk dilakukan pemeriksaan FISH/CISH. Namun pemeriksaan CISH/FISH masih merupakan pemeriksaan semikuantitatif yang memiliki banyak kelemahan diantaranya memiliki tingkat subyektifitas cukup tinggi pada pembacaan karena harus menentukan jumlah amplifikasi DNA secara mikroskopik. Selain itu teknik FISH cukup mahal dan harus menggunakan mikroskop fluoresensi. Pemeriksaan metode CISH/FISH juga memerlukan proses pengerjaan cukup lama yaitu 2-3 hari dengan kapasitas sampel yang dikerjakan terbatas (maksimal 20 sampel/proses) sedangkan metode PCR hanya memerlukan waktu 1 hari dengan

biaya lebih murah dan dapat melakukan lebih dari 100 sampel/proses. Berdasarkan pertimbangan ini banyak penelitian telah dilakukan dengan metode PCR untuk menggantikan metode lainnya dalam mendeteksi status her2/neu.

4. Kesimpulan

Metoda PCR dibandingkan dengan metoda IHK memiliki sensitivitas 57,14%, spesifisitas 81,81%, Nilai prediksi positif 50,00% dan nilai prediksi negatif 87,71%. Metode PCR dapat digunakan untuk mendeteksi amplifikasi DNA her2/neu pada kasus-kasus penderita karsinoma payudara menggunakan blok paraffin tersimpan. Penggunaan metode PCR untuk mendeteksi amplifikasi her2/neu masih perlu optimalisasi alat dan standarisasi prosedur kerja sehingga dapat meningkatkan nilai sensitivitasnya. Pemeriksaan PCR her2/neu dari blok paraffin sangat dipengaruhi oleh bahan dan kualitas fiksasi, kualitas blok paraffin dan proses ekstraksi DNA. Spesifisitas dan Nilai Prediksi Negatif yang tinggi menjadi dasar kuat pentingnya pemeriksaan her2/neu menggunakan metode PCR. Dengan pertimbangan biaya yang ekonomis, waktu pemeriksaan lebih cepat, tingkat ketelitian tinggi (kuantitatif) dan nilai spesifisitas tinggi, metode PCR dapat menjadi metode pengganti IHK untuk mendeteksi amplifikasi DNA her2/neu. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan penelitian sejenis lainnya yang menggunakan sampel blok paraffin lebih banyak dan prosedur ekstraksi DNA yang lebih sempurna sehingga akan menghasilkan nilai sensitivitas dan nilai prediksi positif yang lebih tinggi.

Daftar Acuan

1. Colditz G, Chia KS. 2012. Invasive breast carcinoma: Introduction and general features. *In* Lakhani SR (editor). WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th edition (page 14-22) . IARC, Lyon.
2. Konigshoff M, Wilhelm J, Bohle RM, Pingoud A, et al. 2003. Her2/neu Gen

- Copy Number Quantified by Real-Time PCR: Comparison of Gene Amplification, Heterozygosity, and Immunohistochemical Status in Breast Cancer Tissue. *Clin Chem J* 49(2): 219-229.
3. Allred C, Miller K, Viale G, Brogi E, Isola J. 2012. Molecular testing for estrogen receptor, progesterone receptor, and her2. *In* Lakhani SR (editor). WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th edition (page 22-23) . IARC, Lyon.
 4. Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, Tabiti K, et al. 2006. Real-time PCR complements immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer. *BMC Clin Path J* 6(2):1-8, (<http://www.biomedcentral.com>.diakses Januari 2013).
 5. Rosen PP. 2009. Rosen's Breast Pathology. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, (page 358-393), Philadelphia.
 6. Dabbs, DJ. (2010). Diagnostic Immunohistochemistry, Theranostic and Genomic Application. 3rd. edition. Elsevier Saunders (page:1-57). Philadelphia.
 7. O' Malley FP, Parkes R, Latta E, Tjan S, Zadro T, et al. 2001. Comparison of HER2/neu Status Assessed by Quantitative Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 115(4).
 8. Lyon E, Millson A, Lowery MC, Woods R, Wittwer CT. 2001. Quantification of HER2/neu Gene Amplification by Competitive PCR Using Fluorescent Melting Curve Analysis. *Clin Chem J* 47(5):844-851.
 9. Purnomosari D, Aryandono T, Setiaji K, Nugraha SB, et al. 2006. Comparison of multiplex ligation dependent probe amplification to immunohistochemistry for assessing Her2/neu amplification in invasive breast cancer in Molecular analysis of early onset Indonesian breast cancer. *Biotechnic & Histochemistry* 81(2-3): 79-85.
 10. Ellis IO, Collins L, Ichihara S, MacGrogan G. 2012. Invasive carcinoma of no special type *In* Lakhani SR (editor). WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th edition (page 34-38) . IARC, Lyon.
 11. Seth R, Angelika B, Harrietta JK. 2012. Analysis of HER2/neu Gene Amplification in Microdissected Breast Cancer Tumour Samples. Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre and Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto.
 12. Tinambunan A. 2012. Hubungan antara ekspresi topoII α dengan karakteristik histopatologi dan status reseptor hormone pada karsinoma mamma primer dengan her2 positif. Tesis SpPA: halaman 1.