

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

**KORELASI EKSPRESI *CATHEPSIN D*
DENGAN RESIKO TERJADINYA METASTASIS
PADA KARSINOMA TIROID TIPE PAPILER**



PPDS. IB. 14/10
Far
k

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Oleh :

Lesap Heru Farolan, dr

Pembimbing :

Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr., Sp.B(K)Onk.

Tulus Panuwun, dr.,MS , Sp.PA(K)

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-I
BAGIAN ILMU BEDAH FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA / RUMAH SAKIT UMUM DR.SOETOMO
SURABAYA
2008**

**KORELASI EKSPRESI *CATHEPSIN D*
DENGAN RESIKO TERJADINYA METASTASIS
PADA KARSINOMA TIROID TIPE PAPILER**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR

**Untuk memenuhi persyaratan dalam Program Pendidikan
Dokter Spesialis I Program Studi Ilmu Bedah
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Telah diuji di hadapan Panitia Ujian Karya Akhir
Pada hari Rabu, 16 Januari 2008**

Oleh :

Lesap Heru Farolan, dr

**KORELASI EKSPRESI *CATHEPSIN D* DENGAN RESIKO
TERJADINYA METASTASIS PADA KARSINOMA
TIROID TIPE PAPILER**

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

Telah disetujui oleh
Panitia Penguji pada tanggal 16 januari 2008
Sebagai persyaratan dalam Program Pendidikan Ilmu Bedah
FK Unair / RSU. Dr. Soetomo Surabaya

Panitia penguji karya akhir

Ketua :



Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr., Sp.B(K)Onk.

Anggota :

1. Prof. Dr. Paul Tahalele, dr., FCTS, FINACS

1.

2. Urip Murtedjo, dr., SpB(K)KL

2.

3. Tulus Panuwun, dr., MS, SpPA(K)

3.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT. yang senantiasa melimpahkan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah akhir **KORELASI EKSPRESI *CATHEPSIN D* DENGAN RESIKO TERJADINYA METASTASIS PADA KARSINOMA TIROID TIPE PAPILER**, sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis bidang studi Ilmu Bedah di Bagian Ilmu Bedah FK UNAIR/RSU Dr. Soetomo Surabaya.

Saya menyadari bahwa dalam penulisan laporan karya tulis ilmiah akhir ini masih jauh dari sempurna, untuk itu dengan rendah hati saya mengharapkan kritik dan saran agar laporan karya tulis ilmiah akhir ini menjadi lebih baik dan lebih sempurna.

Akhir kata saya ucapkan terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada semua pihak yang telah ikut membimbing, mendidik, dan membantu saya selama menempuh pendidikan program pendidikan spesialis saya.

Dalam kesempatan ini, saya menyatakan rasa terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi Ilmu Bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan spesialis dalam bidang studi Ilmu Bedah di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
3. Direktur Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya atas kesempatan yang diberikan kepada saya sehingga dapat bekerja sekaligus menimba ilmu di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya.

CORRELATION EXPRESSION OF CATHEPSIN D WITH METASTATIC RISK IN PAPILLARY THYROID CARCINOMA

Lesap Heru Farolan*, Sunarto Reksoprawiro*, Tulus panuwun**

* Dept. of Surgery, Faculty of Medicine Airlangga University/Dr. Soetomo Hospital Surabaya

** Dept. of Pathology, Faculty of Medicine Airlangga University/Dr. Soetomo Hospital Surabaya

ABSTRACT

Background : Cathepsin D is proteolytic enzyme that widely distributed in human cells. Previous study revealed the increasing expression of cathepsin D in breast cancer, endometrial cancer, brain cancer, and lung cancer. Cathepsin D plays an important role on metastatic and tumour growth by : increases degradation of matrix extracellular, stimulates angiogenesis, apoptosis inhibition, stimulates growth factors, and inactivates of growth inhibitors. Cathepsin D was identified as an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer.

Objective : To find wether the increasing expression of cathepsin D could increase the metastatic risk in papillary thyroid carcinoma.

Method : The design of this study is case control. The samples are all paraffin block of papillary thyroid carcinoma patients stored in Department of Pathology Dr. Soetomo Hospital Surabaya, in the period of 2004-2007. Twenty paraffin blocks were divided into two group, ten samples with distant metastasis and ten samples without distant metastasis cases. Statistical analysis was based on the chi-square and four fold table to find odds ratio. Subject are documented from medical document in the medical record Dr. Soetomo Hospital Surabaya. All specimen were stained with immunohistochemistry technique using monoclonal catehepsin D antibody to know the cathepsin D expression. The grade of staining intensity and semiquantitative number of stained cells were determined as 0-3 and 0-4 respectively. The score of cathepsin D expression was calculated as multiply the grade of staining intensity and semiquantitative number of stained cells. The datas was statitiscally analysed using chi-square and four fold table.

Result : The frequency of papillary thyroid carcinoma in female was higher than male with ratio of 4 : 1, with mode of age was 41- 50 years old (50 %). Fifty percent of distant metastatic cases occured in age group of 41-50 years old. Fifty percent of metastatic site was bone and 40 % was lung. All specimen showed positive cathepsin D imunostaining. The mean score of distant metastatic cases was 10,8 and the mean score of no distant metastasis cases was 7. Statistical analysis using Chi-square found that the increasing of cathepsin D expression had a correlation with distant metastatic evidence in papillary thyroid carcinoma ($p=0,03$). Four fold table analysis showed the result of 36 (confident interval 95% : 3,242 – 356,8), showed that imunostaining with strong intensity (3+) in up to 60 % cells was a significant risk factor for distant metastasis in papillary tyhroid carcinoma.

Conclusion : Cathepsin D expressed in all 20 samples of papillary thyroid carcinoma. There was significant correlation between increasing of cathepsin D expression with distant metastasis in papillary thyroid carcinoma. Positive imunostaining with strong intensity (3+) in up to 60 % cells was a significant risk factor for distant metastasis in papillary tyhroid carcinoma.

Key words : Cathepsin D, papillary thyroid carcinoma, metastasis

DAFTAR ISI



SAMPUL DALAM	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat teoritis	3
1.4.2 Manfaat klinis	4
BAB 2 TINJAUAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Karsinoma Tiroid	5
2.1.1 Etiologi karsinoma tiroid	5
2.1.2 Klasifikasi karsinoma tiroid	7
2.1.3 Metastasis karsinoma tiroid papiler	10

	2.1.4 Stadium karsinoma tiroid	12
2.2	Pertumbuhan infiltratif dan pembentukan metastasis	
	Sel Kanker	14
	2.2.1 <i>Lysosomal protease</i>	16
	2.2.2 <i>Cathepsin D</i>	17
	2.2.3 <i>Cathepsin D</i> pada kelenjar tiroid	22
	2.2.4 <i>Aplikasi klinis cathepsin D</i>	23
	2.2.5 Deteksi ekspresi <i>cathepsin D</i> Dengan pemeriksaan imunohistokimia	24
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL	
	3.1 Kerangka konseptual	28
	3.2 Hipotesis	29
BAB 4	METODE PENELITIAN	
	4.1 Jenis dan rancangan penelitian	30
	4.2 Populasi, sampel, besar sampel, teknik pengambilan sampel, kriteria inklusi dan eksklusi	30
	4.2.1 Populasi	30
	4.2.2 Sampel	30
	4.2.3 Besar sampel	30
	4.2.4 Pengambilan sampel	32
	4.2.5 Kriteria inklusi	32
	4.2.4 Kriteria eksklusi	32
	4.3 Variabel Penelitian	32
	4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian	33
	4.5 Kerangka Operasional.	34
	4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	34

4.7	Jadwal Penelitian	34
4.8	Tahap Penelitian	35
4.9	Analisis Data	36
4.10	Biaya Penelitian	36
BAB 5	HASIL PENELITIAN	
5.1	Karakteristik Sampel Penelitian	37
5.2	Analisis hasil penelitian	44
BAB 6	PEMBAHASAN	
6.1	Gambaran umum hasil penelitian	46
6.2	Korelasi antara ekspresi <i>cathepsin D</i> dengan resiko Terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe Papiler	49
6.3	Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam Pemeriksaan imunohistokimia <i>cathepsin D</i>	53
BAB 7	RINGKASAN	60
BAB 8	KESIMPULAN DAN SARAN	62
	DAFTAR PUSTAKA	63

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 1. Zone aliran limfatik primer (kompartemen sentral) dan sekunder Dari kelenjar tiroid	12
Gambar 2. Langkah-langkah metastasis sel kanker dan peran <i>cathepsin D</i>	16
Gambar 3. Struktur molekul dan skematik molekul <i>cathepsin D</i>	18
Gambar 4. Skema reaksi hidrolisa ikatan peptida oleh peran katalisator enzim <i>Protease cathepsin D</i>	18
Gambar 5. Skema reaksi antigen – antibodi <i>Avidin Biotin Complex (ABC)</i> Untuk mendeteksi adanya antigen	26
Gambar 6. Tahap-tahap pemeriksaan imunohistokimia metode tidak langsung	27
Gambar-gambar hasil pemeriksaan imunohistokimia <i>cathepsin D</i>	40

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1.1	Distribusi jenis kelamin dan umur penderita karsinoma tiroid tipe papiler	37
Tabel 5.1.2	Distribusi kejadian metastasis jauh menurut umur dan jenis kelamin penderita karsinoma tiroid tipe papiler ..	38
Tabel 5.1.3	Distribusi lokasi metastasis jauh penderita karsinoma tiroid tipe papiler	39
Tabel 5.1.4	Distribusi varian karsinoma tiroid tipe papiler	39
Tabel 5.2.1	Korelasi antara ekspresi <i>cathepsin D</i> dengan metastasis Jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler	44
Tabel 5.2.2	Distribusi kejadian metastasis jauh berdasarkan Prosentase sel yang tercat positif dengan intensitas Kuat (3+) terhadap <i>cathepsin D</i> pada karsinoma tiroid Tipe papiler	45

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 : Teknik pengecatan hematoksilin eosin cara Meyer
- Lampiran 2 : Teknik pulasan imunohistokimia dengan antibodi *mouse monoclonal cathepsin D* dari sediaan parafin blok
- Lampiran 3 : Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi *cathepsin D* pada karsinoma tiroid.
- Lampiran 4 : Analisis statistik *Chi-Square*
- Lampiran 5 : Analisis statistik *Four fold table*

DAFTAR SINGKATAN

AMES	: <i>Age – Metastasis – Extention – Size</i>
TSH	: <i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
MEN	: <i>Multiple Endocrine Neoplasma</i>
VIP	: <i>Vasoactive Intestinal Peptide</i>
ECM	: <i>Extra Cellular Matrix</i>
MMPs	: <i>Matrix Metallo Proteinase</i>
uPA	: <i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
CTL	: <i>Cytotoxic T – Lymphocyte</i>
NK cell	: <i>Natural Killer cell</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
kDa	: <i>Kilo Dalton</i>
ER / PR	: <i>Estrogen Receptor / Progesteron Receptor</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribonucleic acid</i>
IGF	: <i>Interstitial Growth Factor</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
ATP	: <i>Adenosine Trphosphate</i>
HIER	: <i>Heat Induced Epitope Retrieval</i>
PIER	: <i>Proteolytic Induced Epitope Retrieval</i>
DAB	: <i>Diamino Benzidine</i>
ABC	: <i>Avidin Biotin Complex</i>
LSAB	: <i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar belakang Masalah

Karsinoma tiroid merupakan keganasan yang menempati urutan ke-9 diantara 10 jenis keganasan terbanyak ⁽¹⁾. Selama tahun 2002, diseluruh dunia ditemukan kasus baru karsinoma tiroid mencapai 141.000 penderita, jumlah ini merupakan 1,3 % dari seluruh penderita kanker baru ⁽²⁾. Angka kejadian kanker tiroid di Amerika serikat berkisar 40 penderita per 1 juta penduduk ⁽²⁾. Sebagian besar karsinoma tiroid (98 %) ialah tipe deferensiasi baik. Ada 2 tipe karsinoma tiroid berdeferensiasi baik, yaitu tipe papiler (75%), dan disusul tipe folikuler (15%). Frekuensi karsinoma tiroid berdeferensiasi baik lebih sering pada wanita daripada laki-laki, dengan perbandingan antara 2:1, sedangkan frekuensi untuk tipe anaplastik dan meduler tidak ada perbedaan antara wanita dan laki-laki ⁽³⁾. Insiden karsinoma tiroid pada anak kurang lebih 1,4 % dari seluruh keganasan, umumnya adalah tipe papiler, dan 20 % didapatkan metastase ke paru. Kurang lebih 50 % nodul tiroid pada anak adalah kanker tiroid ⁽³⁾. Penderita dengan karsinoma tiroid tipe papiler biasanya memiliki prognosis baik dengan angka ketahanan hidup 10 tahun sebesar 93% pada tipe papiler dan 85% tipe folikuler ⁽³⁾. Namun demikian, kedua tipe karsinoma ini dapat menjadi agresif pada 5-27 % penderita dan mengalami kekambuhan lokoregional, menyebabkan prognosis yang buruk dan kematian ^(3,4). Angka kekambuhan karsinoma tiroid tipe papiler mencapai 35% dalam kurun waktu 40 tahun ⁽³⁾. Adanya metastasis pada karsinoma tiroid ini, dapat meningkatkan angka kekambuhan, dan merupakan faktor yang memperburuk prognosis ^(3,4).

Salah satu sifat terpenting dari sel kanker adalah kemampuan untuk infiltrasi ke dalam jaringan sekitarnya dan pembentukan metastasis. Proses terjadinya metastasis ini sangat kompleks yang melibatkan berbagai macam interaksi antara sel tumor dengan *host*.

Mekanisme yang sangat penting pada terjadinya metastasis adalah *tumor growth*, *angiogenesis*, *adhesion cell*, dan proteolisis.⁽⁵⁾ Proteolisis terjadi karena kemampuan sel tumor meningkatkan produksi enzim protease. Enzim protease ini menyebabkan peningkatan degradasi matriks ekstraseluler dan membran basal, sehingga sel dengan mudah bermigrasi menembus stroma dan membran basal, juga menembus pembuluh darah untuk bermetastasis jauh⁽⁶⁾. Salah satu enzim proteolitik yang dikeluarkan oleh sel kanker adalah *cathepsin D*. Peningkatan ekspresi enzim proteolitik pada sel kanker merupakan petunjuk adanya peningkatan agresifitas dari sel kanker^(7, 8)

Berbagai sistem skoring telah dikembangkan untuk memprediksi prognosis penderita karsinoma tiroid tipe papiler. Salah satu sistem skoring yang dipakai adalah kriteria AMES yang merupakan singkatan dari *age*, *metastasis*, *extention*, dan *size*. Kriteria ini merupakan prediktor yang baik dalam menentukan resiko kekambuhan dan kematian pada karsinoma tiroid tipe papiler^(9, 10).

Beberapa tahun terakhir, banyak dilakukan penelitian biologi molekuler pada kanker tiroid. Penelitian-penelitian biologi molekuler tentang peran *cathepsin D* pada tiroid masih sedikit. Penelitian ini dikembangkan untuk menjawab pertanyaan-pertanyaan dan kontroversi atas peran *cathepsin D* pada proses terjadinya metastase kanker tiroid dan hubungannya dengan prognosis. Pada penelitian Metaye (1995) memberikan kesimpulan bahwa terjadi peningkatan ekspresi *cathepsin D* pada karsinoma tiroid tipe papiler dibandingkan dengan sel tiroid normal. Ekspresi *cathepsin D* pada karsinoma tiroid juga berkorelasi dengan besarnya tumor, dimana didapatkan ekspresi *cathepsin D* yang tinggi pada pT4 dibandingkan dengan pT2 dan pT3, sedangkan tipe histologi sel kanker tidak berkorelasi dengan ekspresi *cathepsin D*. Tetapi penelitian Metaye ini tidak memberikan kesimpulan tentang peran *cathepsin D* pada kejadian metastasis dan hubungannya dengan prognosis⁽¹¹⁾. Pada penelitian Holm (1995) memberikan kesimpulan bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara

ekspresi *cathepsin D* dan kejadian metastasis kelenjar limfe dan metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe meduler. Tetapi penelitian Holm ini juga belum dapat memberikan kesimpulan tentang peran *cathepsin D* pada kejadian metastasis pada karsinoma tipe papiler dan hubungannya dengan prognosis⁽¹²⁾.

Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini akan dicari bagaimana korelasi ekspresi *Cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler.

1.2 Rumusan masalah

Apakah peningkatan derajat ekspresi *cathepsin D* dapat meningkatkan resiko terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui ekspresi *Cathepsin D* pada karsinoma tiroid tipe papiler.

1.3.2 Tujuan khusus

Mengetahui korelasi antara ekspresi *Cathepsin D* dengan karsinoma tiroid tipe papiler yang sudah terjadi metastasis jauh.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Pemeriksaan ekspresi *Cathepsin D* dapat digunakan sebagai parameter untuk menentukan derajat agresifitas karsinoma tiroid tipe papiler.

1.4.2 Manfaat klinis

1. Derajat ekspresi *Cathepsin D* dapat digunakan sebagai faktor prognosis.
2. Dengan mengetahui adanya korelasi antara ekspresi *Cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler, maka dimungkinkan pemberian inhibitor *Cathepsin D* sebagai salah satu modalitas terapi untuk menghambat proses metastasis pada keganasan tersebut.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Tiroid

Karsinoma tiroid merupakan keganasan endokrin yang paling banyak dijumpai (89%), dan merupakan 2 % dari seluruh karsinoma pada manusia⁽¹³⁾. Karsinoma tiroid berasal dari sel folikel atau sel parafolikuler kelenjar tiroid^(14, 15). Angka kejadian tersebut lebih tinggi pada daerah gondok endemis, terutama tipe yang tidak berdiferensiasi.⁽¹⁵⁾ Kanker ini didapat pada segala usia dengan puncak pada usia muda (7-20 tahun) dan usia setengah baya (40-60 tahun). Rasio angka kejadian pada laki-laki dibanding wanita adalah 1 : 2,7, tetapi rasio kematiannya adalah 2 : 1. Diferensiasi pada kanker tiroid lebih banyak didapatkan pada wanita dibandingkan dengan laki-laki^(3, 15). Karsinoma tiroid tipe papiler umumnya terjadi pada umur kurang dari 40 tahun, tipe folikuler umumnya terjadi pada umur lebih dari 40 tahun, sedangkan tipe anaplastik umumnya terjadi diatas 60 tahun.^(3, 15) Angka mortalitas karsinoma tiroid adalah 6 %⁽¹³⁾.

2.1.1 Etiologi Karsinoma Tiroid

Penyebab pasti karsinoma tiroid sampai saat ini belum diketahui dengan jelas, namun terdapat beberapa faktor predisposisi yang dapat meningkatkan resiko timbulnya karsinoma tiroid, antara lain : rangsangan TSH jangka panjang misalnya pada defisiensi yodium, tonjolan tunggal tiroid, radiasi daerah leher, jenis kelamin dan umur, faktor genetik, dan penyakit tiroid yang mendasari⁽¹⁵⁾.

Defisiensi yodium menyebabkan hipotiroid dan terjafi peningkatan sekresi TSH serta kompensasi berupa pembesaran kelenjar tiroid. Pembesaran kelenjar tiroid yang awalnya difus, kemudian akan diikuti pembentukan nodul multipel. Rangsangan TSH jangka panjang

akan menyebabkan degenerasi keganasan. Di negara dimana diet yodiumnya rendah didapatkan peningkatan relatif karsinoma folikuler dan anaplastik^(13,15).

Tonjolan tunggal tiroid merupakan predisposisi terjadinya keganasan sebesar 9,97 – 30%. Keganasan pada nodul tunggal tiroid 65 % adalah tipe papiler, dan 28,9 % merupakan tipe folikuler. Keganasan dengan tonjolan ganda tiroid 42,8 % berupa tipe papiler, dan 57,2% berupa tipe folikuler⁽¹⁷⁾.

Paparan radiasi dengan dosis 1 Gy pada daerah leher saat usia anak-anak akan meningkatkan resiko terjadinya karsinoma tiroid sebesar 33 – 37 %..^(13, 15). Periode laten antara paparan dan saat diagnosis adalah antara 5 – 40 tahun. Terdapat hubungan linier antara dosis paparan dengan resiko terjadinya karsinoma. Kecenderungan untuk terjadinya karsinoma tiroid lebih tinggi pada paparan radiasi saat usia kurang dari 5 tahun dibandingkan anak yang lebih tua, dan karsinoma yang timbul umumnya tipe papiler⁽¹⁵⁾. Paparan radiasi ini diperkirakan dapat menyebabkan kerusakan *DNA* dari sel folikel tiroid yang selanjutnya bisa terjadi transformasi neoplasma. Perubahan susunan domain *tyrosin kinase* pada gen *RET* dan *TRU* ditemukan pada karsinoma tipe papiler. Perubahan ini terjadi 60-80 % setelah adanya paparan radiasi. Selain itu juga ditemukan bahwa mutasi gen *RAS* yang merupakan petanda awal pada tumorogenesis tiroid^(13,15).

Insiden karsinoma tiroid pada laki-laki terus meningkat dengan bertambahnya usia, sedangkan pada wanita insiden meningkat cepat pada usia muda dan menjadi datar setelah usia 30 tahun. Adanya insiden yang lebih banyak pada wanita sering dihubungkan dengan adanya pengaruh hormon reproduksi. Pengaruh umur terhadap prognosis karsinoma berdeferensiasi baik telah jelas diketahui. Angka rekurensi dan mortalitas meningkat bila karsinoma tiroid ditemukan pada usia 40 – 50 tahun. Pada wanita peningkatan angka rekurensi dan mortalitas terjadi secara dramatis pada usia diatas 50 tahun. Perbedaan dengan kasus pada laki-laki ini disebabkan oleh pengaruh perubahan hormon yang terjadi saat

menopause. Pada kasus karsinoma tiroid berdeferensiasi baik yang terjadi pada wanita usia muda, umumnya tidak akan berubah menjadi tumor yang letal dengan bertambahnya usia.⁽³⁾

Faktor genetik, yaitu adanya mutasi gen yang berhubungan dengan karsinoma tiroid berdeferensiasi baik, belum diketahui secara pasti. Dua puluh persen karsinoma meduler dihubungkan dengan adanya *MEN* (*Multiple endocrine neoplasia*) tipe II. Beberapa publikasi juga mengemukakan adanya hubungan antara karsinoma tiroid tipe papiler dengan *familial cancer* seperti *Gardner syndrome*, *Cowden's syndrome*, dan *Carney complex*⁽¹⁾.

Pada penelitian didapatkan adanya hubungan antara penyakit *Grave's* dengan karsinoma tiroid. Diduga reseptor antibodi tiroid dapat memacu pertumbuhan tumor, tetapi pernyataan ini masih kontroversial. Limfoma tiroid sering terjadi pada penderita yang pernah menderita tiroiditis kronis limfositik (tiroiditis Hashimoto)⁽³⁾.

2.1.2 Klasifikasi Karsinoma Tiroid

Karsinoma tiroid dibagi menjadi tiga kategori yaitu⁽¹⁴⁾:

1. Diferensiasi baik: tipe papiler dan tipe folikuler
2. Berdiferensiasi jelek / anaplastik (tipe sel spindel dan sel raksasa)
3. Meduler

a. Karsinoma Papiler

Karsinoma papiler merupakan jenis karsinoma tiroid terbanyak, yaitu sekitar 60-80% dari seluruh karsinoma tiroid^(14, 16). Karsinoma tiroid tipe papiler ini merupakan 65,8 % dari keganasan tiroid dengan nodul tunggal⁽¹⁷⁾. Tipe ini dapat mengenai semua usia dan tampaknya merupakan satu-satunya tipe karsinoma tiroid pada anak, terutama dengan riwayat radiasi daerah leher. Angka kejadian terbanyak terjadi pada usia antara 40-49 tahun⁽²¹⁾. Tumor ini lebih sering menyebar melalui aliran limfe (50%) dan jarang menyebar melalui pembuluh darah (5%)⁽³⁾.

Secara makroskopis tumor ini berbatas tegas, 90% tidak berkapsul, padat tetapi kadang-kadang kistik, kalsifikasi atau osifikasi. Delapan persen kasus multisentris, dan seringkali mengenai kedua lobus⁽³⁾.

Secara mikroskopis didapatkan bentukan papil-papil, yaitu stroma fibrovaskuler yang dilapisi epitel anaplastik. Sel dengan bentukan “*orphan Annie eyes*” pada intinya, atau disebut juga *ground glass*. Gambaran *pseudo inclusion* atau *intranuclear grooves*, yaitu invaginasi sitoplasma sehingga tampak sel dengan cekungan pada sisinya. Diagnosa ditegakkan dari gambaran inti sel tersebut, walaupun gambaran papil tidak didapatkan. Ciri khas lain yang dapat memastikan tipe papiler adalah adanya *psammoma bodies*, yaitu kalsifikasi jaringan ikat yang terletak diujung papil. Terdapat beberapa variasi karsinoma tipe papiler yaitu : *encapsulated variant*, *follicular variant*, *tall cell variant*, *diffuse sclerosing variant*, dan *hyalinizing trabecular tumor*⁽³⁾. Prognosis karsinoma tiroid tipe papiler ini cukup baik, daya tahan hidup 10 tahun mencapai 90%, dengan angka kekambuhan 10 – 20 %, dan metastase jauh 10 – 15 %⁽³⁾.

b. Karsinoma Folikuler

Karsinoma folikuler timbul pada kelompok usia yang lebih tua, paling sering pada wanita dengan usia antara 50 sampai 59 tahun, dan banyak timbul di daerah endemik dimana terjadi defisiensi yodium. Tipe ini jarang terjadi pada usia kurang dari 30 tahun. Angka kejadiannya lebih jarang dari karsinoma papiler, yaitu 10 sampai 20% dari seluruh karsinoma tiroid. Karsinoma folikuler terjadi karena mutasi *RAS family* dari onkogen⁽¹⁵⁾.

Secara makroskopis tipe ini berupa suatu nodul tiroid tunggal dan berkapsul. Secara mikroskopis, adanya invasi tumor pada kapsul, pembuluh darah dan pembuluh limfe merupakan faktor kunci untuk membedakan karsinoma folikuler dari adenoma folikuler. Karsinoma folikuler mempunyai varian yaitu karsinoma sel *hurtle* (3%). Metastasis tumor terutama melalui pembuluh darah ke paru-paru atau tulang (20-30%) dan jarang menyebar ke

kelenjar getah bening^(17,19,21). Secara keseluruhan penderita dengan karsinoma folikuler memiliki daya tahan hidup 5 tahun sebesar 70%⁽³⁾.

c. Karsinoma Anaplastik

Karsinoma anaplastik didapatkan pada 10-15% karsinoma tiroid. Jenis karsinoma ini lebih sering terjadi pada usia tua (sekitar 65 tahun) dan wanita lebih dominan^(3, 14). Hampir 50% penderita mempunyai riwayat *multinoduler goiter*, sedangkan 20 – 30 % karena mengalami transformasi *differensiated carcinoma* seperti karsinoma tipe papiler⁽¹⁶⁾. Tumor bersifat sangat agresif dan memiliki potensi metastasis yang tinggi, baik hematogen maupun limfogen. Tumor ini sangat cepat membesar sampai memenuhi leher, infiltrasi ke jaringan otot dan jaringan leher yang lain menyebabkan sesak nafas, suara hilang, batuk, dan sukar menelan. Dikatakan bahwa karsinoma anaplastik disebabkan karena hilangnya gen supresor p53.⁽³⁾

Secara morfologi, karsinoma anaplastik terdiri dari sel anaplastik meliputi : sel *giant* pleiomorfik besar, sel *spindle* dengan gambaran sarkomatos, sel campuran, dan sel kecil. Pemeriksaan mikroskopis, kadang-kadang ditempat tertentu terdapat gambaran karsinoma tipe folikuler atau tipe papiler, menunjukkan bahwa asal mulanya karsinoma anaplastik berasal dari tumor tersebut. Daya tahan 5 tahun untuk penderita ini tidak lebih dari 5%⁽¹⁴⁾.

d. Karsinoma Meduler

Karsinoma meduler berasal dari sel parafolikuler (*C cell*) tiroid yang mensekresi kalsitonin, merupakan 5-10% dari karsinoma tiroid^(1,3). Karsinoma ini dapat merupakan bagian dari penyakit neoplasia endokrin multipel (*MEN*) tipe II, sebagai penyakit familial yang bukan neoplasia endokrin multipel, atau sporadis (80%)⁽¹⁾. Karsinoma meduler yang familial biasanya bilateral (90%) dan multifokal, sedangkan yang sporadik biasanya unifokal^(1,3). Gambaran makroskopis berupa jaringan lunak berwarna pucat abu-abu sampai kemerahan. Secara mikroskopis menunjukkan sel ganas poligonal sampai bentuk *spindle*,

atau trabekular. Juga terdapat pembentukan folikel-folikel dengan pembentukan jaringan amiloid yang berasal dari jaringan stroma. Kalsitonin bisa dilihat pada sitoplasma atau pada bahan amiloid. Pada kasus familial sering bisa dilihat adanya *multicentric C cell hiperplasia* dalam parenkim tiroid. Selain kalsitonin, karsinoma meduler juga mensekresi *somatostatin*, *serotonin*, dan *vasoactive intestinal peptide (VIP)*. Metastasis dapat terjadi secara hematogen ke paru, hati, dan tulang, maupun limfogen. Pada umumnya prognosis karsinoma ini terletak antara karsinoma tipe papiler dan anaplastik⁽¹⁴⁾.

2.1.3 Metastasis Karsinoma Tiroid Papiler

Karsinoma tiroid tipe papiler umumnya bermetastasis melalui kelenjar getah bening leher (50 %), dan 10 % mengalami metastasis jauh (paru, tulang dan saraf pusat). Adanya metastasis jauh ini menyebabkan angka harapan hidup 1 tahun, hanya 50 %. Empat puluh sampai tujuh puluh persen penderita karsinoma tipe papiler yang timbul pada umur lebih dari 40 tahun, ditemukan penyebaran ke kelenjar getah bening di leher. Sedangkan pada anak dibawah umur 15 tahun dengan karsinoma tipe papiler, hampir 90 % terdapat metastasis di kelenjar getah bening daerah leher⁽³⁾.

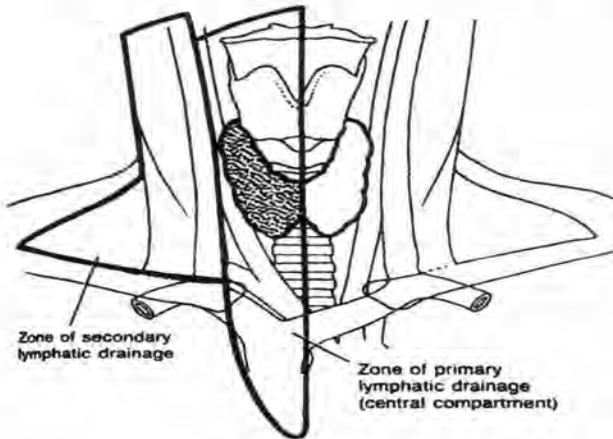
Secara umum, penyebaran dari daerah *isthmus* tiroid akan ke atas menuju kelenjar *prelaryngeal (Delphian)*, dan kebawah menuju kelenjar mediastinum. Bagian sentral dan bawah dari masing-masing lobus lateral tiroid akan menyebar ke bawah menuju kelenjar trakeoesofageal sepanjang perjalanan nervus rekuren. Pada bagian superior dan posterior dari lobus tiroid penyebaran akan menuju daerah kelenjar retrofaring, dengan konsekuensi terjadi metastasis daerah mediastinum dan basis kranii. Semua aliran limfe tersebut diatas disebut kompartemen sentral dan merupakan zone aliran limfatik primer dari kelenjar tiroid. Selain itu terdapat zone aliran limfatik sekunder, yaitu sepanjang jugularis interna, dan daerah trigonum posterior (gambar 1)^(3, 18, 19).

Pada penelitian klinis didapatkan bahwa metastasis melalui kelenjar limfe dari karsinoma tiroid tipe papiler terjadi pertama kali pada kelenjar paratrakeal, tanpa memperdulikan letak tumor primer. Pada stadium awal, metastasis melalui kelenjar limfe ini lebih sering terjadi pada leher bagian bawah, dan pada stadium lanjut baru terjadi metastasis ke leher bagian atas dan submandibula. Diperkirakan hal ini terjadi akibat adanya sumbatan limfatik karena peningkatan ukuran tumor primer, juga akibat sumbatan limfatik karena metastasis pada kelenjar pretrakeal dan paratrakeal⁽³⁾.

Berdasarkan ekstensinya, karsinoma tiroid tipe papiler dibagi menjadi *occult* (diameter < 1 cm), intratiroid (diameter > 1 cm masih terbatas di dalam kelenjar), dan ekstratiroid (menembus kapsul tiroid dan menginvasi struktur sekitar seperti laring, trakea, esofagus). Umumnya karsinoma tipe papiler yang invasif mempunyai sifat yang lebih agresif. Ekstensi ekstratiroid ini sangat menentukan angka rekurensi dan prognosis. Angka kematian pada kasus kasus intratiroid adalah 3 %, sedangkan kematian pada kasus ekstratiroid adalah 16 %. Kasus ekstratiroid sering didapatkan pada penderita dengan usia lebih dari 40 tahun. Angka rekurensi setelah subtotal tiroidektomi adalah 30 % setelah 30 tahun, dibandingkan dengan 26 % setelah total atau *near* total tiroidektomi. Pada penelitian Mazzaferi dan Jhiang (1994) memberikan kesimpulan bahwa faktor resiko terjadinya rekurensi dan mortalitas dipengaruhi oleh : ukuran tumor (> 4-5 cm), jenis kelamin (laki-laki lebih agresif dibandingkan wanita), adanya invasi kapsul atau pembuluh darah dan limfe, multisentris, dan ditemukannya metastase⁽³⁾.

Faktor utama yang menurunkan ketahanan hidup penderita adalah ditemukannya metastasis jauh, yang terjadi pada sekitar 10 – 15% penderita karsinoma papiler. Hal tersebut berhubungan dengan kejadian invasi tumor pada pembuluh darah intra maupun ekstratiroid (2-14%). Sebagaimana dilaporkan oleh Gardner dkk bahwa 40% penderita dengan invasi pada pembuluh darah ekstratiroid, dan 26,1% pada penderita dengan invasi pembuluh darah

intratiroid mengalami metastasis jauh, sedangkan pada penderita tanpa invasi tumor pada pembuluh darah hanya 4% terjadi metastasis jauh. ^(19,20)



Gambar 1 : Zone aliran limfatik primer (kompartemen sentral) dan sekunder dari kelenjar tiroid (Diambil dari Roy B, Kenneth D. Cancer of the thyroid gland. In : Harrison LB, Session RB, Hong WK, editors. Head and neck cancer, A Multidisciplinary approach. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.p.721.)⁽³⁾

2.1.4 Stadium Karsinoma Tiroid

Saat ini, sistem untuk mengklasifikasi tumor ganas padat yang paling banyak digunakan adalah sistem TNM. Secara umum sistem ini menentukan stadium tumor ganas berdasarkan ukuran dan derajat invasi tumor, penyebaran ke kelenjar getah bening, dan metastasis jauh. Pada karsinoma tiroid, sistem ini juga memperhitungkan jenis histologi tumor dan usia penderita untuk menentukan stadiumnya ⁽¹⁰⁾.

Klasifikasi karsinoma tiroid berdasarkan sistem TNM adalah sebagai berikut ⁽²¹⁾:

T: tumor primer

T0 : tidak ada tumor

T1 : tumor < 1cm, terbatas dalam kelenjar tiroid

T2 : tumor > 1cm, tetapi < 4cm, terbatas dalam kelenjar tiroid

T3 : tumor > 4cm, terbatas dalam kelenjar tiroid

T4 : tumor tumbuh keluar kapsul tiroid

N: metastasis kelenjar getah bening

N1a : metastasis kelenjar getah bening leher ipsilateral

N1b : metastasis kelenjar getah bening leher bilateral/ kontralateral/ mediastinum

M: metastasis jauh

M0 : tidak ada metastasis jauh

M1 : ada metastasis jauh

a. Tipe papiler atau folikuler

	Usia < 45 th	usia > 45 th
Stadium I	tiap T, tiap N, M0	T1 N0 M0
Stadium II	tiap T, tiap N, M1	T2,3 N0 M0
Stadium III		T4 N0 M0 tiap T N1a M0
Stadium IV		tiap T N1b M0 tiap T tiap N M1

b. Tipe meduler

Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2,3,4 N0 M0
Stadium III	tiap T N1 M0
Stadium IV	tiap T tiap N M1

c. Tipe anaplastik : selalu stadium IV

2.2 Pertumbuhan infiltratif dan pembentukan metastasis sel kanker

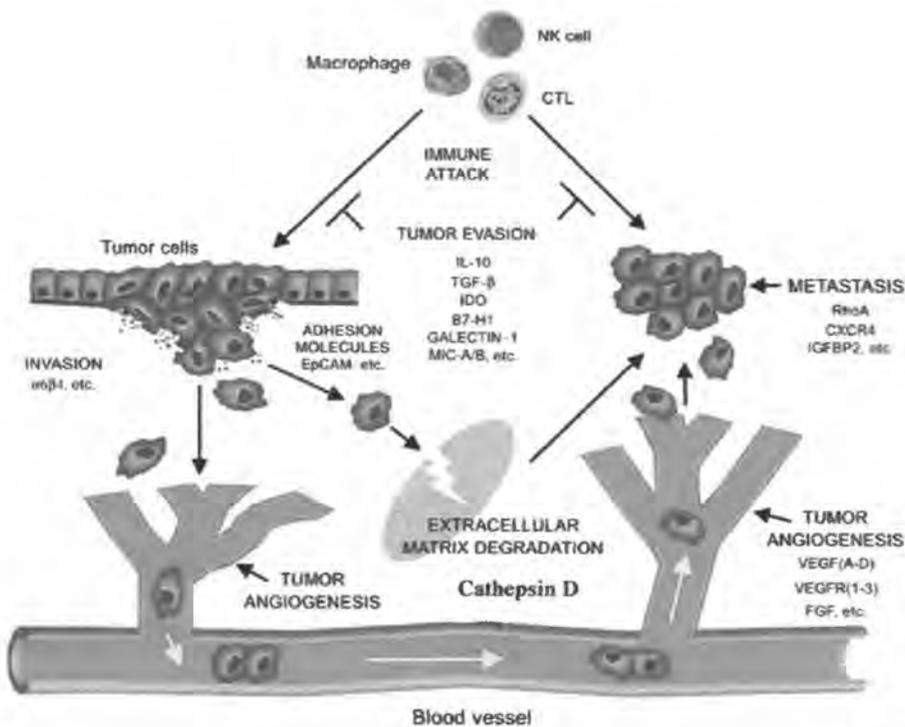
Salah satu sifat terpenting dari sel kanker adalah kemampuan melakukan infiltrasi ke dalam jaringan sekitarnya. Karena kemampuan infiltrasi ini, sel-sel kanker dapat menembus matriks ekstraseluler dan membran basal sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan ke dalam organ didekatnya. Sel kanker juga dapat menembus ke dalam saluran limfe dan pembuluh darah yang selanjutnya dapat terjadi metastasis ke organ lain. Metastasis adalah kemampuan sel tumor untuk berpindah ke tempat yang jauh dari tumor primer dan tumbuh ditempat organ yang dituju. Proses metastasis ini sangat penting karena menandakan suatu prognosis yang buruk. Kemampuan invasi dan metastasis dari sel kanker ini disebabkan karena perubahan sifat sel ganas, yaitu perubahan biokimia permukaan sel, penambahan motilitas, kemampuan mengeluarkan enzim proteolitik, merangsang pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis), dan berkurangnya adhesi sel tumor satu dengan lainnya.^(5, 6, 7)

Kosep dasar dari langkah-langkah terjadinya metastasis, pertama adalah terjadinya proses terlepasnya adhesi sel kanker dari kelompoknya (*detachment*). Sel-sel dalam jaringan normal berhubungan erat satu sama lain, molekul-molekul adhesi sangat berperan penting pada hubungan ini. Molekul adhesi yang terpenting adalah *E-cadherine* (glikoprotein transmembran) dan *integrin*. Dari penelitian akhir-akhir ini ternyata bahwa sel kanker yang infiltratif kehilangan ekspresi *E-cadherine*-nya, sehingga hubungan antar sel-sel tumor terlepas^(5, 6, 7)

Selanjutnya, agar dapat menembus matriks ekstraseluler (*ECM = extra cellular matrix*) yang berada di sekitar sel kanker, maka sel kanker harus melekat pada matriks ekstraseluler. Hal ini dimungkinkan karena sel kanker mempunyai reseptor terhadap *laminin* dan *fibronectin* yang ekspresinya lebih banyak daripada sel normal. *Laminin* dan *fibronectin* merupakan komponen dari matriks ekstraseluler. Sel kanker juga mengekspresikan *integrin*, yang berfungsi sebagai reseptor *fibronectin*, *collagen*, dan *vitronectin* (komponen lain

matriks ekstraseluler). Setelah sel kanker melekat pada matriks ekstraseluler, maka sel tumor akan menciptakan jalan untuk migrasi. Sel-sel kanker harus menghancurkan matriks ekstraseluler dengan cara mengeluarkan enzim proteolitik. Enzim proteolitik yang terpenting adalah *matrix metalloproteinase (MMP)*, *urokinase plasminogen activator (uPA)*, dan *cathepsin D*. Ekspresi yang tinggi dari enzim-enzim proteolitik ini dapat memberi probabilitas kejadian metastasis yang tinggi dari kanker tersebut. Setelah sel kanker menghancurkan matriks ekstra seluler dan membran basal pembuluh darah, maka tahap selanjutnya adalah sel kanker masuk kedalam pembuluh limfe dan pembuluh darah , untuk itu diperlukan peningkatan gerakan sel kanker (motilitas). Sel kanker mengeluarkan *autocrine motility factor* yang dapat meningkatkan motilitas sel kanker. Beberapa bahan lain seperti *complement derived materials*, *collagen peptides*, *formyl peptides*, dan bahan lain dari jaringan ikat dapat berfungsi sebagai *chemoattractans* yang dapat meningkatkan motilitas sel kanker. Sel kanker yang ada dan bertahan didalam sirkulasi akhirnya sampai ke tempat organ yang dituju. Hal ini dimungkinkan karena adanya interaksi antara sel kanker dengan endothel pembuluh darah dari jaringan yang akan menjadi tempat pertumbuhan metastasisnya. Sel kanker akan mengeluarkan molekul adhesi yang merupakan reseptor pada endotel pembuluh darah. Salah satu molekul adhesi yang banyak dikenal adalah CD44^(5, 6, 7).

Perjalanan tahapan metastase sel kanker tidaklah mudah, sel kanker harus bertahan dan menghindari dari sistim pertahanan humoral dan seluler dari *host* yang bertugas mengeliminasi sel kanker. Pertahanan seluler diantaranya dilakukan oleh sel makrofag, *cytotoxic* limfosit (*CTL*), dan *natural killer cell (NK cell)* . Tubuh juga membuat *inhibitor* terhadap *tumor growth factor*, *inhibitor angiogenesis*, dan *inhibitor protease* yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan sel kanker. Kurang lebih hanya 0,01 % sel kanker yang masih bertahan di dalam pembuluh darah yang pada akhirnya akan berkembang menjadi metastasis jauh.(gambar 2)^(5,22).



Gambar 2. Langkah-langkah metastase sel kanker dan peran *cathepsin D* (Diambil dari Pai SI, Lin YY, Macaes B, Hung CF. Gene therapy, prospect of RNA interference therapy. may 2007 (cited 2007 jun 6). Available from : URL:HYPERLINK : <http://www.nature.com/gt/journal/v13/n6/images/3302694fa.html>.)

2.2.1 Lysosomal protease

Lysosome berasal dari bahasa Yunani yang artinya “digestif body”. *Lysosome* adalah salah satu organel dari sel yang mempunyai fungsi untuk mendegradasi berbagai macam makromolekul protein melalui proses *autophagocytosis* (dari sitoplasma), *endocytosis* (dari ekstraseluler), atau melalui jalur sekresi. *Lysosome* juga berperan dalam protein sel “turn over”, pelepasan *endocytosed nutrients*, inaktivasi organisme patogen, repair membran plasma, dan proses *loading* dari antigen ke molekul *major histocompatibility complex (MHC) class III*. *Lysosome* terdapat pada semua sel manusia kecuali sel darah merah^(23,24,25).

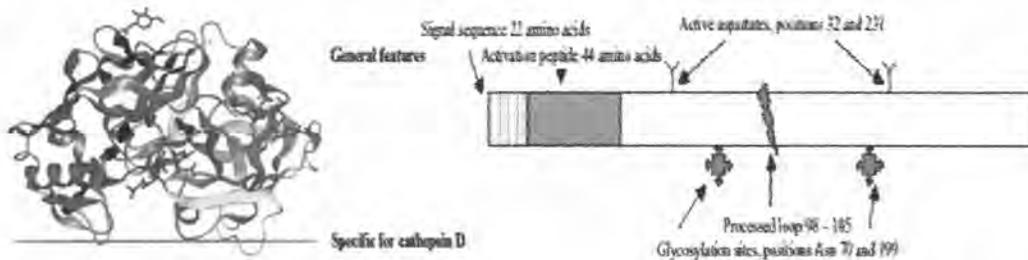
Degradasi protein oleh *lysosome* diperankan oleh berbagai enzim protease yang terdapat didalamnya. Terdapat 4 klas utama dari enzim protease yang terdapat didalam *lysosome*, yaitu *serine protease* (*uPA* = *urokinase plasminogen activator*, *Cathepsin G*), *MMPs* (*matrix metalloproteinase*), *cystein protease* (*Cathepsin B, C, K, L, O, S, V, W*) dan *aspartic protease* (*Cathepsin D, dan E*). *Cathepsin D* adalah protease yang utama pada grup ini ⁽⁶⁾. Perbedaan subklas dari *cathepsin* ini terdapat pada letak dari jenis asam amino yang aktif. Selain bekerja mendegradasi protein intra seluler, enzim protease juga disekresi ke ekstraseluler, dan berperan dalam degradasi matriks ekstraselular, menginduksi pertumbuhan invasif fibroblas, dan menginduksi apoptosis ^(23,24,25).

Hampir semua *lysosomal protease* ini mempunyai peran dalam degradasi membran basal. Dengan aktifitas ini sel kanker dapat menembus stroma, matriks ekstraseluler, membran basal, dan endotel pembuluh darah untuk bermetastasis jauh ⁽²⁵⁾.

2.2.2 *Cathepsin D*

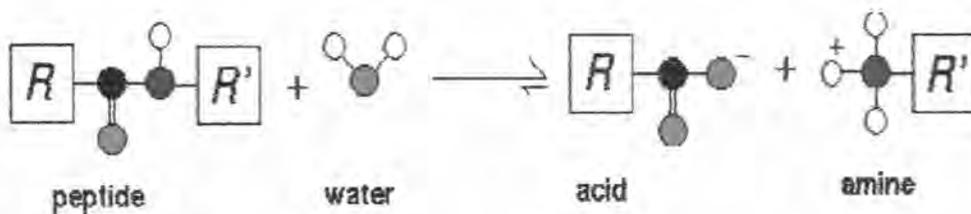
Cathepsin D (EC 3.4.23.5) adalah *lysosomal acid hydrolase*, suatu enzim protease golongan *aspartic peptidase* yang terdapat dalam *lysosome*. *Cathepsin D* disintesa di *rough endoplasmic reticulum* sebagai *prepro-enzym* yang inaktif. Pada manusia, gen *cathepsin D* terdiri dari 9 *exon* yang berada pada kromosom 11p15. Regulasi transkripsi *cathepsin D* dilakukan oleh faktor *c-myc*. Pada proses maturasi, *pepro-enzim* ini mendapat penambahan *mannose-6 phosphate (M6P)* dengan bantuan enzim *N-acetylglucosaminyl phosphotransferase* dan *N-acethylglycoaminylphosphat glycosidase* sehingga terbentuk *procathepsin D* dengan berat molekul 52 kDa (*kilo Dalton*). Struktur ini terdiri dari 392 asam amino. *Procathepsin D* ini selanjutnya mengalami translasi dan transportasi menuju *lysosome*. Dalam suasana asam *procathepsin D* mengalami pemecahan peptida (proses *autoproteolisis* oleh *cystein lysosomal protease*) membentuk *cathepsin D* dengan berat

molekul 44 kDa (terdiri dari 348 asam amino). *Cathepsin D* ini akhirnya dipecah menjadi 2 bagian, yaitu *heavy chain* (31 kDa) dan *light chain* (14 kDa). Ketiga bentuk *cathepsin D* (44 kDa, 31 kDa, dan 14 kDa) ini mempunyai kemampuan yang sama dalam degradasi protein. *Cathepsin D* mempunyai struktur bilobus, yang masing-masing lobusnya mengandung *active site aspartic acid residu* (*Asp32* dan *Asp215*) dan grup karbohidrat tunggal. (Gambar 3)



Gambar 3. Struktur molekul dan skematik molekul *cathepsin D* (Diambil dari Fusek M, Dual Role of Cathepsin D : Ligand and Protease, Biomed J, 2005, 149(1):2)

Aspartat ini menempati posisi sekaligus mengaktifkan molekul air, kemudian menghidrolisa (degradasi) ikatan substrat peptida menjadi asam amino yang lebih kecil (gambar 4)⁽²⁸⁾. Enzim protease yang lain dari golongan *aspartic protease* adalah *pepsin* dan *renin*.^(22,24,25)



Gambar 4. Skema reaksi hidrolisa ikatan peptida oleh peran katalisator enzim protease *cathepsin D* (Diambil dari : Protein degradation, Neuromuscular disease, Washington Univ. 2007 (cited 2007 jun). Available from : [URL:HYPERLINK](http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/degrade.htm&h) : <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/degrade.htm&h>)

Cathepsin D mempunyai kemampuan untuk mendegradasi berbagai macam substrat protein seperti : *myosin, actin, proteoglycans, fibronectin, laminin*, dan kolagen tipe IV (kolagen membran basal). Hasil degradasi protein ekstraseluler ini menghasilkan asam amino yang dapat digunakan untuk bahan makanan dan suplai asam amino dari sel kanker itu sendiri. Pada percobaan *in vitro*, di dalam sel kanker payudara ditemukan adanya vesikel asam intraseluler (*LAVs*) dengan diameter 5 μm . Vesikel ini berisi *cathepsin D* dengan jumlah banyak dan bahan-bahan fagositosis ekstraseluler seperti *latex bead* dan matriks ekstraseluler sehingga tampak sebagai *large heterophagosome*. Aktifitas fagositosis dengan vesikel *large heterophagosome* ini tidak terdapat pada sel normal, tetapi hanya terdapat pada sel yang khusus berfungsi fagositosis yaitu sel makrofag dan netrofil *polymuclear*. Kemampuan heterofagositosis material ekstraseluler dan digesti oleh *cathepsin D* ini menjelaskan mengapa sel kanker dengan peningkatan ekspresi *cathepsin D* mempunyai kemampuan tinggi untuk melakukan invasi dan metastasis⁽²⁵⁾. Seperti halnya *lysosomal protease* yang lain, *cathepsin D* bekerja optimal pada pH asam (pH : 4,5 – 5). Suasana asam ini juga diperlukan dalam proses *auto activation* dari *procathepsin D*. Selain mempunyai fungsi sebagai enzim protease, *Cathepsin D* juga mempunyai peran non enzimatik, yaitu *cellular protein turnover, antigen processing*, proses inflamasi, aktivasi prekursor *pro cathepsin D*, aktivasi prohormon lain, dan menginduksi apoptosis⁽²³⁾. Tidak seperti *lysosomal protease* yang lain, *cathepsin D* tidak mempunyai *tissue inhibitor endogen*. *Cathepsin D* dan prekusornya yaitu *pro Cathepsin D* lebih banyak diproduksi oleh sel kanker dari pada sel normal^(23,24,25)

Peningkatan ekspresi dari *Cathepsin D* pada beberapa solid tumor merupakan indikator resiko tinggi terjadinya invasi dan metastasis⁽²⁵⁾. Pada karsinoma payudara terjadi peningkatan ekspresi *cathepsin D* sebesar 2 - 50 kali lipat dibandingkan dengan sel payudara normal. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* (lebih dari 70 pmol/mg protein) pada karsinoma

payudara dengan kelenjar getah bening negatif, mempunyai resiko terjadinya metastase 7–10 kali lipat. Pada kanker payudara dengan *ER (estrogen reseptor)* positif, terjadi peningkatan *initiation transcription mRNA cathepsin D* oleh stimulasi estrogen (regulasi estrogen) dan *growth factor*. *Cathepsin D* dapat digunakan sebagai faktor prognostik independen pada kanker payudara, kanker endometrium, dan kanker otak ^(24, 26). Fukuda (2005) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kadar serum *cathepsin D* pada penderita *high grade glioma* sangat meningkat dibandingkan dengan *low grade glioma*. Data ini memberikan kesimpulan bahwa *cathepsin D* pada keganasan banyak disekresikan ke ekstraseluler dan merupakan indikator potensial dari agresifitas tumor ⁽²⁶⁾.

Cathepsin D mempunyai kemampuan untuk melakukan inaktivasi, menghancurkan, dan menghambat sekresi *IGF-binding protein 3*, suatu molekul yang berfungsi sebagai *secreted growth inhibitor* (penghambat pertumbuhan sel kanker). *Cathepsin D* juga mempunyai kemampuan untuk melakukan aktivasi beberapa *growth factor* dan sitokin yang berada di matriks ekstraseluler (*ECM*), seperti *pro TGFβ* yang berfungsi melakukan fasilitasi terhadap invasi sel kanker, dan *fibroblast growth factor (FGF)* yang mempunyai aktivitas sebagai *growth factor* dan stimulasi angiogenesis ⁽²⁷⁾. Selain itu *Cathepsin D* mempunyai kemampuan untuk melakukan aktivasi *procathepsin B*, *cathepsin B*, dan *pro urokinase plasminogen activators*. Berchem (2002) dalam penelitiannya menyatakan bahwa peningkatan ekspresi *cathepsin D* menyebabkan penurunan proses *apoptosis* sampai 80 %, hal ini memberikan kesempatan sel tumor tetap tumbuh dan berkembang ⁽²⁷⁾. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* pada solid tumor akan mempercepat proses metastasis, mempercepat proliferasi sel kanker primer dan metastasis, meningkatkan resiko rekurensi, dan memperpendek *disease free survival* ^(25, 26, 27).

Konsekuensi dari peningkatan *cathepsin D* pada sel kanker adalah peningkatan dari *procarthepsin D*. Pada sel kanker terjadi perubahan penurunan akumulasi *mature cathepsin D*

(34 kDA) dan peningkatan produksi proenzim baik intraseluler maupun ke ekstraseluler, hal ini menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi *cathepsin D* di intraseluler maupun ekstraseluler. *Procathepsin D* mengalami autoaktivasi di intraseluler maupun ekstraseluler bila dalam suasana asam (pH 5,5). Autoaktivasi ekstraseluler ini dimungkinkan oleh karena suasana ekstraseluler pada sel kanker bersifat asam. Suasana asam ini diciptakan oleh sel kanker karena kemampuannya melepas proton ke lingkungan ekstraseluler melalui produksi asam laktat dan pompa $H^+ / ATPase$ di membran plasma ^(26, 27).

Procathepsin D selain sebagai prekursor dari *cathepsin D*, juga berperan sebagai *autocrine mitogen*, yaitu mampu berinteraksi dengan reseptor membran sel di sekitar sel kanker untuk merangsang *growth factor*, sehingga mempunyai potensi proliferasi yang lebih tinggi. *Procathepsin D* juga berperan dalam pembentukan metastasis sel kanker. Sifat mitogenik *procathepsin D* ini disebabkan karena : aktifitas proteolitik saat ekspose dengan suasana asam, adanya *sacharidic moieties (phosphorylated)*, adanya struktur primer yang berinteraksi dengan molekul terlarut dan tidak terlarut (*membrane bounded*), juga oleh karena mekanisme yang belum diketahui ^(24). Pada kanker payudara didapatkan peningkatan *procathepsin D* yang signifikan dalam serum penderita. Peningkatan *procathepsin D* juga didapatkan pada kanker otak, paru, tiroid, gaster, liver, pankreas, prostat, buli-buli, dan lain-lain ^(24, 25, 26).

Procathepsin D tidak hanya berfungsi sebagai prekursor dari enzim hidrolitik *cathepsin D*, tetapi juga berinteraksi dengan molekul-molekul lain yang mempunyai efek mitogenik. Interaksi ini merupakan bagian dari fungsi fisiologis *procathepsin D*. Peningkatan ekspresi *procathepsin D* dapat merangsang pertumbuhan sel *parental* dan sel-sel disekitarnya, ini akan memacu pertumbuhan sel dan mempercepat terjadinya metastase⁽²⁴⁾. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* pada sel kanker ini disebabkan karena adanya overekspresi gen *cathepsin D* dan adanya proses perubahan pada prekursor protein akibat mutasi ^(24).

2.2.3 *Cathepsin D* pada kelenjar tiroid

Dari pemeriksaan *immunogold labeling*, didapatkan bahwa konsentrasi aktivitas partikel *cathepsin D* pada sel tiroid normal dan sel karsinoma tiroid tipe papiler adalah pada *lysosome* atau *phagosome*. Hal ini menunjukkan bahwa lokalisasi *cathepsin D* tidak berubah selama transformasi keganasan pada sel tiroid⁽²⁹⁾. Pada sel tiroid normal, TSH dapat menginduksi sintesis dan sekresi *cathepsin D* didalam cairan ekstraseluler, tetapi peran TSH lebih kecil di intraseluler. Bentuk *cathepsin D* yang dominan di dalam kelenjar tiroid adalah 31-kDa. Pada penelitian Metaye (1993) didapatkan bahwa kadar *Cathepsin D* pada karsinoma tiroid lebih tinggi daripada kelenjar tiroid normal. Kadar *Cathepsin D* pada karsinoma tiroid juga berkorelasi dengan besarnya tumor, dimana didapatkan kadar yang tinggi pada pT4 dibandingkan dengan pT2 dan pT3, tetapi tidak berkorelasi dengan tipe histologi sel kanker⁽¹¹⁾. Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa *cathepsin D* dapat digunakan sebagai faktor prognosis berdasarkan ukuran (*size*) tumor, tetapi tidak dapat menjelaskan peran *cathepsin D* hubungannya dengan kejadian metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler⁽¹¹⁾. Tidak seperti pada karsinoma payudara, pada karsinoma tiroid didapatkan hanya sedikit reseptor estrogen. Metaye (1991) membuktikan bahwa peningkatan *cathepsin D* pada karsinoma tiroid tidak dipengaruhi oleh hormon estrogen, tetapi murni sebagai tanda aktivitas protease selama proses invasi dari karsinoma tiroid⁽³⁰⁾. Pada penelitian Holm (1995) memberikan kesimpulan bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara ekspresi *cathepsin D* dan kejadian metastasis kelenjar limfe dan metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe meduler. Tetapi penelitian Holm ini juga tidak memberikan kesimpulan tentang peran *cathepsin D* pada kejadian metastasis pada karsinoma tipe papiler dan hubungannya dengan prognosis⁽¹²⁾.



2.2.4 Aplikasi klinis *cathepsin D*

Cathepsin D berhubungan erat dengan terjadinya metastasis pada karsinoma payudara. *Cathepsin D* dapat digunakan sebagai parameter prognosis pada karsinoma payudara^(11, 31). Fukuda (2005) menyatakan bahwa *cathepsin D* merupakan indikator yang potensial untuk menentukan agresifitas dan prognosis dari glioma⁽²⁶⁾. Peningkatan *cathepsin D* juga didapatkan pada kanker endometrium, paru, gaster, liver, pankreas, prostat, buli-buli, dan lain-lain^(24, 25).

Saat ini banyak dikembangkan penelitian untuk menghambat pertumbuhan dan metastasis sel kanker, diantaranya adalah *proteinase inhibitor*. *Pepstatin A* suatu inhibitor spesifik dari *aspartic protease*, sering digunakan untuk purifikasi *cathepsin D* dan penelitian-penelitian untuk mengetahui fungsi *cathepsin D* dalam sistim *in vitro*^(32, 33). *Pepstatin A* adalah inhibitor yang sangat efektif terhadap *cathepsin D* dan *pepsin*. *Pepstatin A* ditemukan oleh Profesor H. Umezawa dari *institute of microbial chemistry* Tokyo Jepang, dan diproduksi oleh *Banyu pharmaceutical Co.* Tokyo Jepang. *Pepstatin A* didapatkan dari hasil kultur filtrat dari berbagai macam spesies *actinomycetes* dari golongan *streptomyces*. *Pepstatin A* adalah molekul non toksik berupa pentapeptida yang terdiri dari dua molekul γ -NH, dua molekul β -OH, dan lima cabang 3- atau 4- rantai samping karbon *aliphatic*. Pentapeptida dari *Pepstatin A* ini bekerja dengan cara rantai samping *aliphatic* mengikat semua *hydrophobic active site*, dan satu atau dua molekul OH akan membentuk ikatan hidrogen dengan molekul COOH dari *cathepsin D*. Ikatan menyebabkan terjadinya inhibisi terhadap aktifitas proteolitik dari *cathepsin D*. Penemuan *pepstatin A* awalnya digunakan untuk inhibitor pepsin pada pengobatan ulkus peptik. Efektifitas pemberian *Pepstatin A* pada terapi kanker masih dalam penelitian^(33, 34). Bahan lain yang mempunyai efek inhibitor terhadap *cathepsin D* adalah garam dengan konsentrasi tinggi, vitamin A, *3-phenylpyruvic*

acid, *dithiothreitol*, dan *indolyl-3-pyruvic*. Bahan-bahan ini tidak mempunyai spesifisitas dan efektifitas yang tinggi terhadap *cathepsin D*, bila dibandingkan dengan *pepstatin A*^(10,35).

2.2.5 Deteksi ekspresi *cathepsin D* dengan pemeriksaan imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia adalah pemeriksaan imunologi dengan menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen tertentu di dalam jaringan. Preparasi jaringan untuk pemeriksaan imunohistokimia harus melalui beberapa tahapan, yaitu : fiksasi jaringan, pembuatan blok parafin (*paraffin embedding*), pemotongan (*sectioning*) dengan mikrotom, preparasi *slide*, *antigen retrieval*, dan pengecatan imunohistokimia.^(36, 37)

Fiksasi jaringan dilakukan dengan tujuan menghentikan dengan cepat proses biokimia yang terjadi dalam jaringan, sehingga dapat mempertahankan arsitektur jaringan dan antigen. Formalin (*10% aqueous formaldehyde solution*) merupakan bahan yang sangat efektif untuk proses ini.^(38, 39)

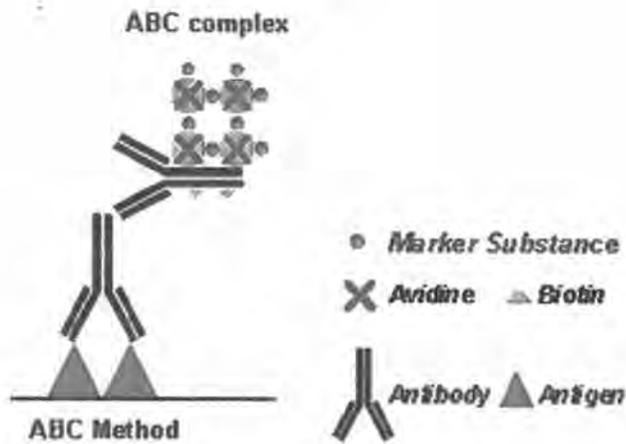
Pembuatan blok parafin bertujuan agar jaringan yang sudah terfiksasi lebih mudah untuk dipotong dengan mikrotom. Tahap awal dilakukan dehidrasi jaringan dengan alkohol, kemudian pemberian *xylene solution*, selanjutnya dimasukkan kedalam parafin hangat. Saat parafin mendingin, akan terbentuk blok parafin. Bahan jaringan yang sudah terfiksir blok parafin dapat mempertahankan arsitektur jaringan dalam waktu yang tak terbatas. Penyimpanan blok parafin dilakukan dengan memasukkan blok parafin kedalam kotak penyimpanan pada suhu kamar. Penyimpanan yang kurang baik akan menyebabkan parafin meleleh dan merusak arsitektur dan antigen jaringan.^(38, 39)

Pemotongan blok parafin menggunakan mikrotom, dengan ketebalan 4-5 mikrometer (1 mikrometer = 1/1000 mm). Potongan jaringan ini diletakkan di *slide* dengan proses *floatated poly-L-lysine (PPL)*, dan pengeringan dengan inkubator. Sebelum dilakukan pengecatan imunohistokimia, preparat *slide* harus dilakukan deparafinisasi (membuang parafin) dan

pemberian *antigen retrieval*. Deparafinisasi dilakukan dengan pemberian *xylene*, *ethanol* 95% dan *ethanol* 100 %, deparafinisasi yang tidak komplis akan menyebabkan hasil pengecatan yang kurang baik. Pemberian *antigen retrieval* bertujuan menghilangkan *methylene bridge* yang terbentuk pada saat fiksasi formalin. *Methylene bridge* ini berupa *cross link protein* yang dapat menutupi antigen. Diharapkan dengan pemberian *antigen retrieval* ini semua antigen dapat teridentifikasi dengan pengecatan imunohistokimia. Ada dua metode *antigen retrieval*, yaitu : *heat mediated (heat induced epitope retrieval = HIER)* dan metode enzimatik (proteolitik *trypsin*, *pronase*, atau *pepsin*)^(40, 41).

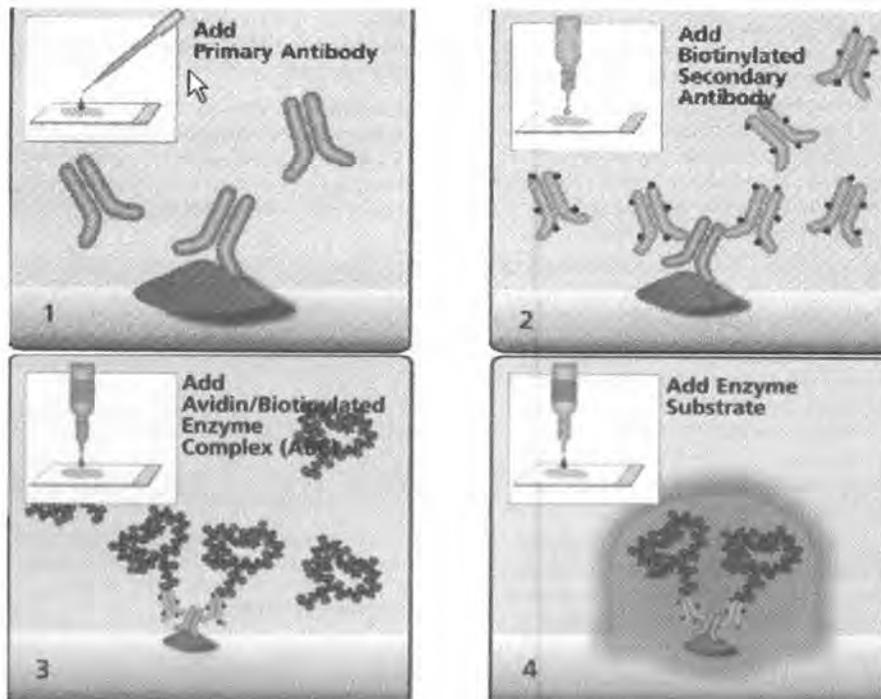
Prinsip dasar pengecatan imunohistokimia adalah terjadinya reaksi kompleks antara antigen dengan antibodi yang telah diberi label. Labelisasi antibodi dilakukan dengan menggunakan aktifitas enzim dan akan menghasilkan warna setelah pemberian *chromogen (marker substance)* ^(41,42).

Ada 2 metode pengecatan imunohistokimia, yaitu metode langsung (*direct*), dan metode tidak langsung (*indirect*). Metode langsung hanya menggunakan satu antibodi. Proses pengecatan lebih cepat, tetapi kurang sensitif karena mempunyai sinyal amplifikasi yang kecil. Metode tidak langsung menggunakan dua antibodi (primer dan sekunder). Antibodi primer melekat langsung dengan antigen, sedangkan antibodi sekunder yang sudah dilakukan labelisasi enzimatik, akan melekat pada antibodi primer. Untuk mendapatkan sinyal amplifikasi yang kuat, digunakan beberapa tehnik yaitu : *Avidin-biotin complex (ABC)*, *Labelled streptavidin biotin (LSAB)*, *HRP Polymer*, dan *Tyramide signal enhancing (TSE)*. Sinyal amplifikasi ini terjadi pada antibodi sekunder. Untuk menghasilkan warna digunakan *chromogen (marker substance)* yang akan bereaksi dengan *avidin-biotin complex*. Beberapa *chromogen* yang bisa digunakan antara lain adalah : *Horseradish peroxidase (HRP)*, *Alkaline phosphatase (AP)*, dan *Glucose oxidase* (gambar 5).^(40,41, 42)



Gambar 5 : Skema reaksi antigen – antibodi *Avidin Biotin Complex (ABC)* untuk mendeteksi adanya antigen. (Diambil dari : Handbook Immunochemical staining methode – Dakocytomation.(cited 2007 jun.) Available from : [URL:HYPERLINK : http://www.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemichal%staining](http://www.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemichal%staining))

Pemeriksaan imunohistokimia untuk mendeteksi *cathepsin D* pada penelitian ini menggunakan metode tidak langsung, amplifikasi sinyal dengan *avidin-biotin complex (ABC)*, dan pewarnaan *chromogen* dengan *horseradish peroxidase (HRP)*. Reaksi antigen-antibodi yang terjadi akan menyebabkan perubahan warna kecoklatan (gambar 6)⁽⁴²⁾.



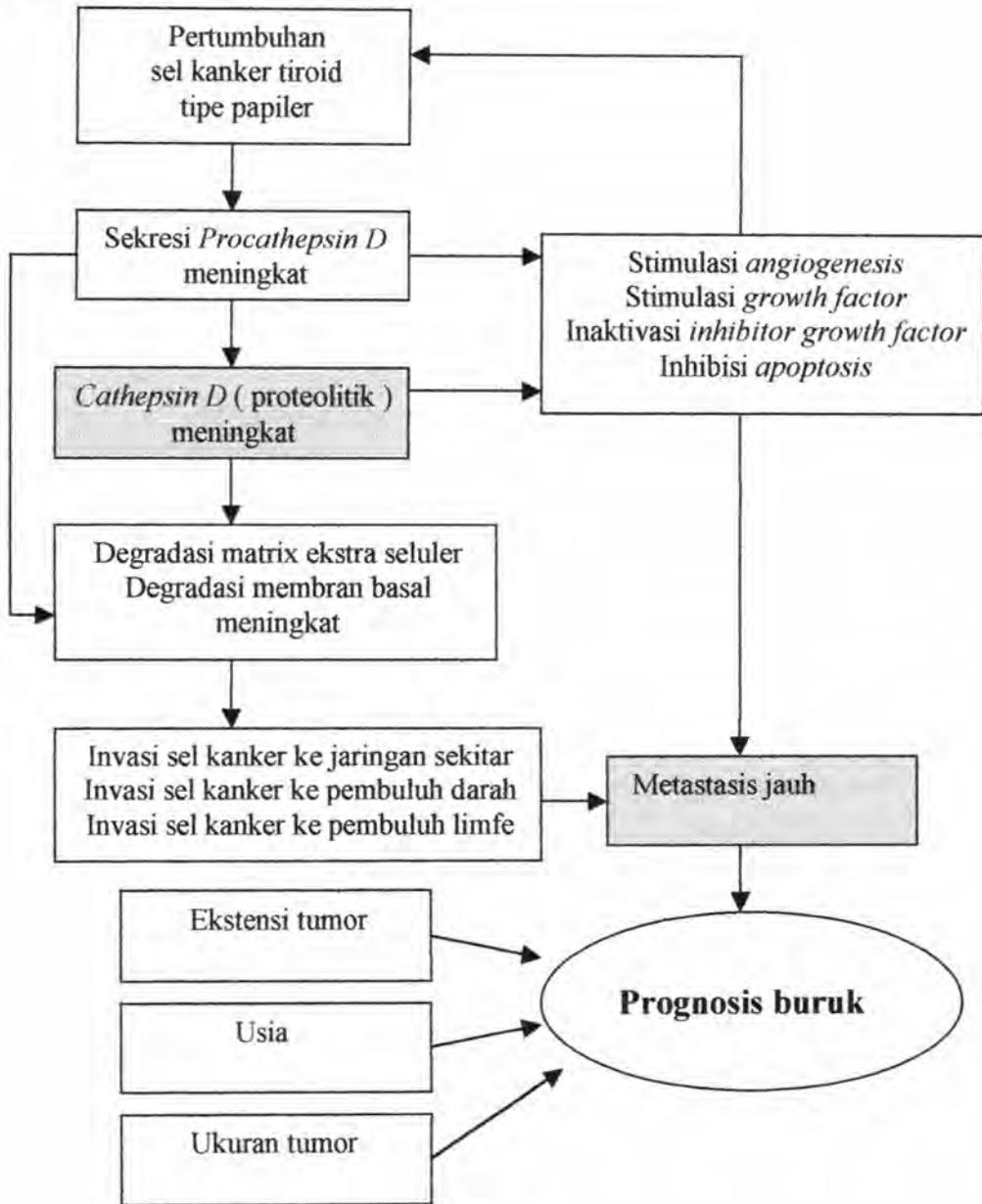
Gambar 6 : Tahap-tahap pemeriksaan imunohistokimia metode tidak langsung : 1) pemberian antibodi primer (akan melekat dengan antigen), 2) pemberian antibodi sekunder yang sudah dilakukan labelisasi (*biotinylated conjugate*), 3) amplifikasi sinyal dengan reaksi *avidin-biotin*, 4) pemberian substrat *chromogen*, sehingga menimbulkan perubahan warna. (Diambil dari : Vectastain ABC method. (cited 2007 jun) . Available from :URL:HYPERLINK : <http://www.reactolab.ch/Vector/ABC%20Method.htm>)

Pemeriksaan imunohistokimia *cathepsin D* menggunakan *monoclonal* tikus anti manusia (Dako Co. Ltd, Kyoto Japan), *cathepsin D* positif bila terwarnai pada sitoplasma. Pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 x. Pemeriksaan *cathepsin D* menggunakan kontrol positif sediaan dari hasil operasi karsinoma payudara dengan *ER / PR* positif, dan sebagai kontrol negatif digunakan jaringan adenoma tiroid yang tidak diwarnai anti *cathepsin D*.⁽⁴³⁾

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual



 : Subyek yang diteliti

3.2 Hipotesis

Peningkatan ekspresi *cathepsin D* akan menyebabkan peningkatan resiko terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui korelasi ekspresi *cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler. Pengamatan dilakukan sesaat pada variabel-variabel yang peristiwanya telah terjadi. Rancangan penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan pendekatan *case control*.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, Teknik Pengambilan Sampel, Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.2.1 Populasi

Populasi penelitian adalah semua blok parafin penderita karsinoma tiroid tipe papiler yang tersimpan di Laboratorium Patologi Anatomi yang secara histopatologis menunjukkan gambaran karsinoma tiroid tipe papiler.

4.2.2 Sampel

Sampel penelitian adalah blok parafin penderita karsinoma tiroid tipe papiler yang telah dioperasi di RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang secara histopatologis menunjukkan gambaran karsinoma tiroid tipe papiler.

4.2.3 Besar Sampel

Besarnya sampel ditentukan menurut perhitungan berdasarkan proporsi karena populasi tidak diketahui, dengan rumus sebagai berikut⁽⁴⁴⁾:

$$n = \frac{\{ Z\alpha \sqrt{2.P_2.(1-P_2)} + Z\beta \sqrt{P_1.(1-P_1) + P_2.(1-P_2)} \}^2}{(P_1 - P_2)^2}$$

$P_1 - P_2$ = Perbedaan resiko diantara dua kelompok

P_1 = Proporsi peningkatan ekspresi *catepsin D* pada kelompok kasus = 0,64

P_2 = Proporsi peningkatan ekspresi *catahepsin D* pada kelompok kontrol = 0,15

$Z\alpha_{0,05}$ = 1,96

$Z\beta_{0,20}$ = 0,842

$$n = \frac{\{ 1,96 \sqrt{2.0,15(1-0,15)} + 0,842 \sqrt{0,64.(1-0,64) + 0,15(1-0,15)} \}^2}{(0,64 - 0,15)^2}$$

$$n = \frac{\{ 1,49 \}^2}{(0,49)^2}$$

$n = 9,2$ dibulatkan menjadi 10

Jadi besar sampel adalah 10 untuk masing masing kelompok, yaitu 10 sampel karsinoma tiroid tipe papiler yang mengalami metastasis jauh, dan 10 sampel karsinoma tiroid tipe papiler yang tidak mengalami metastasis jauh.

4.2.4 Pengambilan Sampel

Sampel diambil secara *purposive sampling*, berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi, yaitu sampel untuk kelompok kasus dan sampel untuk kelompok kontrol.

4.2.5 Kriteria Inklusi

4.2.5.1 Kelompok kasus

1. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan karsinoma tiroid tipe papiler
2. Ukuran tumor 2 – 4 cm (T 2 – 3)
3. Ditemukan metastasis jauh (M 1)
4. Tersedia lengkap blok parafin dan rekam medis penderita

4.2.5.2 Kelompok kontrol

1. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan karsinoma tiroid tipe papiler
2. Ukuran tumor 2-4 cm (T 2 - 3)
3. Tidak ditemukan metastasis jauh (M 0)
4. Tersedia lengkap blok parafin dan rekam medik penderita

4.2.6 Kriteria Eksklusi

Penderita yang telah mendapat terapi radiasi dan atau kemoterapi sebelum operasi.

4.3 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini variabel penelitian yang diteliti adalah:

1. Variabel independen: ekspresi *cathepsin D*.
2. Variabel dependen: metastasis jauh.

4.4 Definisi Operasional Variabel Penelitian

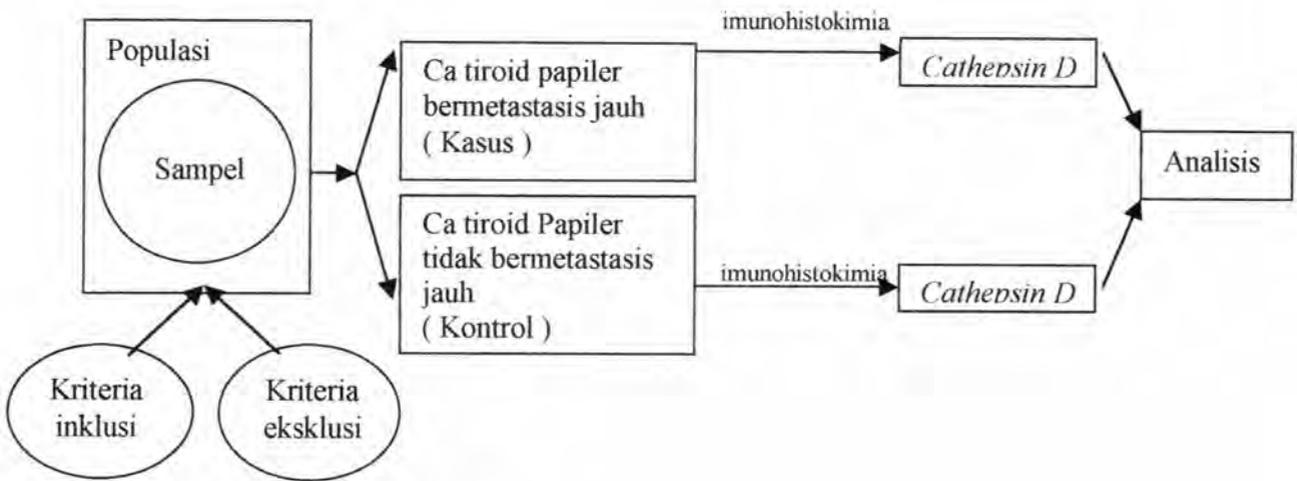
4.4.1 Ekspresi *Cathepsin D*

Merupakan ekspresi *cathepsin D* pada sel karsinoma tiroid tipe papiler. Penghitungan atau skoring dilakukan berdasarkan prosentase sel tumor yang sitoplasmanya tercat positif (berwarna coklat homogen) dari 100 sel tumor dan intensitas *immunostaining*. Skala prosentase tumor positif dinilai secara semikuantitatif : 0 (0% - 4%), 1 (5 % - 24 %), 2 (25% - 49%), 3 (50% - 74%) dan 4 (75% - 100%). Intensitas *immunostaining* ditentukan dengan nilai 0 (negatif), 1+ (lemah), 2+ (positif sedang), 3+ (positif kuat). Bila dalam satu slide terdapat intensitas yang heterogen, maka setiap komponen dinilai secara tersendiri kemudian dijumlahkan seluruhnya. Untuk mendapatkan nilai skor maka dilakukan dengan mengalikan prosentase sel yang tercat positif dengan kekuatan intensitas. Misalnya dalam satu slide didapatkan 25 % sel tumor dengan intensitas kuat ($2 \times 3+ = 6$), 75 % sel tumor tanpa imunoreaksi ($3 \times 0 = 0$), maka skornya adalah $6 + 0 = 6$. Skala penelitian adalah interval.

4.4.2 Metastasis jauh

Didapatkannya anak sebar karsinoma tiroid tipe papiler pada organ lain (metastase jauh). Dinilai positif bila ditemukan anak sebar karsinoma tiroid papiler dan negatif bila tidak ditemukan anak sebar karsinoma tiroid papiler, dengan skala nominal.

4.5 Kerangka Operasional



4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Bagian/SMF Ilmu Bedah dan Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr Soetomo Surabaya.

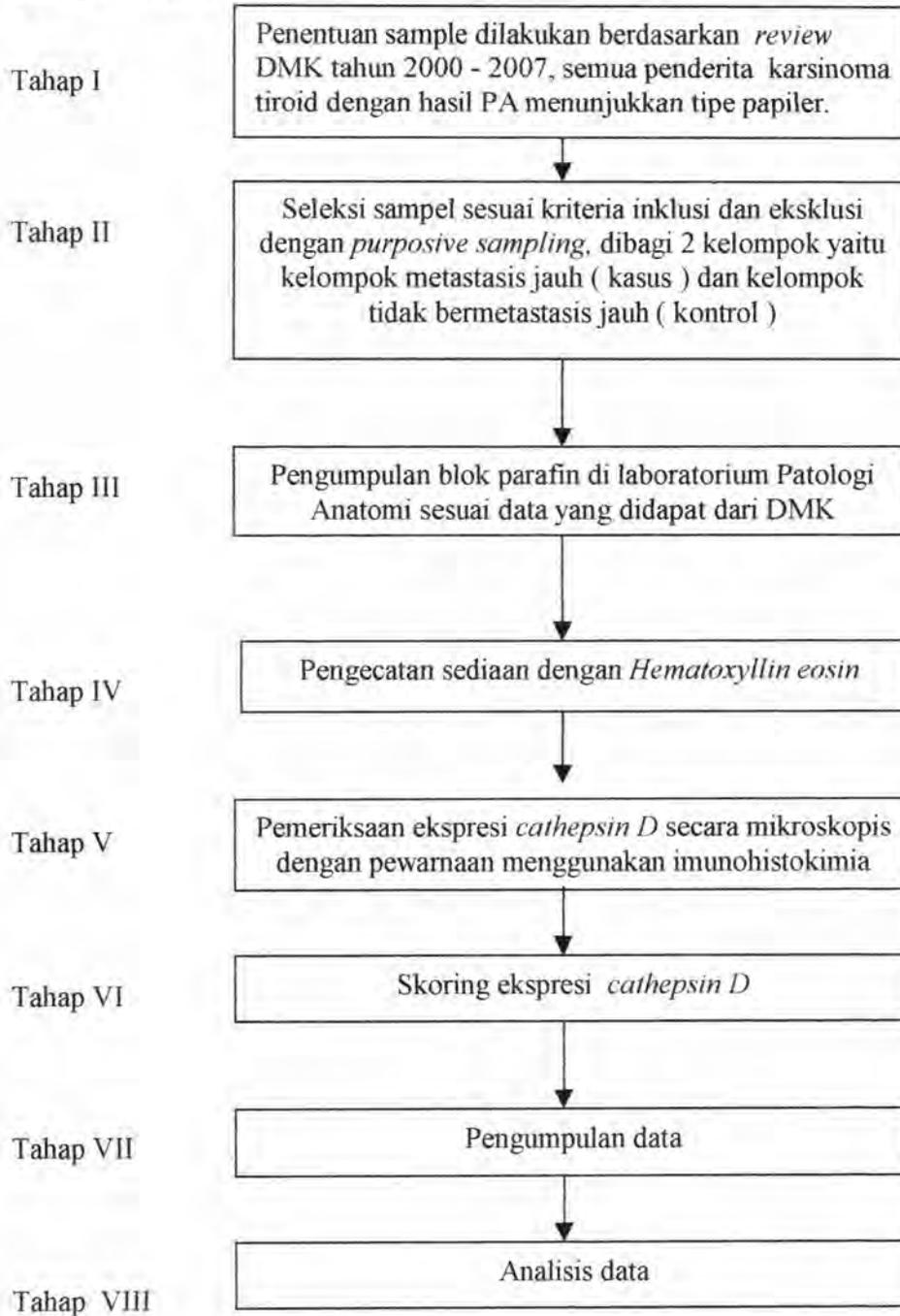
4.6.2 Waktu Penelitian

Selama 6 bulan mulai bulan Juli 2007 sampai November 2007

4.7 Jadwal Penelitian

	Juli 2007	Agustus 2007	September 2007	Oktober 2007	Oktober 2007	November 2007
Penelusuran Pustaka						
Penyusunan Proposal						
Penelusuran DMK						
Pengecatan Preparat						
Analisis Data						
Penyusunan Karya Akhir						

4.8 Tahap Penelitian



4.9 Analisis Data

Untuk mengetahui korelasi antara ekspresi *cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis jauh dilakukan uji *Chi-square*, oleh karena skor ekspresi *cathepsin D* merupakan skala interval sedangkan metastasis jauh adalah skala nominal. Untuk mengetahui apakah *cathepsin D* merupakan faktor resiko untuk terjadinya metastasis jauh, maka digunakan *four fold table* (tabel 2 X 2) untuk mencari *OR (odds ratio)*.

4.10 Biaya Penelitian

1. Alat tulis	Rp. 500.000,-
2. Biaya penelusuran kepustakaan	Rp. 500.000,-
3. Penyusunan proposal dan hasil penelitian	Rp. 1.000.000,-
4. Biaya Konsultasi statistik	Rp. 500.000,-
5. Biaya pemeriksaan imunohistokimia	Rp. 4.500.000,-
6. Biaya tak terduga	Rp. 500.000,-
Total	Rp 7.500.000,-

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Jenis kelamin terbanyak pada penelitian ini adalah wanita, yaitu sebanyak 16 orang (80 %), sedangkan laki-laki sebanyak 4 orang (20 %).

Umur penderita pada penelitian ini adalah berkisar antara umur 21 tahun sampai dengan umur 67 tahun. Kelompok yang terbanyak adalah pada umur 41 – 50 tahun (50 %). Pada jenis kelamin laki-laki terbanyak pada kelompok umur 61 – 70 tahun (15%), sedangkan pada jenis kelamin perempuan terbanyak pada kelompok umur 41-50 tahun (45%).

Tabel 5.1.1 Distribusi jenis kelamin dan umur penderita karsinoma tiroid tipe papiler

Umur (tahun)	Jenis Kelamin		Jumlah (%)
	Laki-laki (%)	Perempuan(%)	
1-10	0	0	0
11-20	0	0	0
21-30	0	1 (5)	1 (5)
31-40	0	2 (10)	2 (10)
41-50	1 (5)	9 (45)	10 (50)
51-60	0	1 (5)	1 (5)
61-70	3 (15)	3 (15)	6 (30)
>70	0	0	0
Jumlah	4 (20)	16 (80)	20 (100)

Pada penderita yang terjadi metastasis jauh, terbanyak pada kelompok usia 40 – 50 tahun (50 %). Pada jenis kelamin laki-laki, metastasis jauh terbanyak pada kelompok umur 61 – 70 tahun (20 %), sedangkan untuk jenis kelamin perempuan terbanyak pada kelompok usia 41 – 50 tahun (40 %)

Tabel 5.1.2 Distribusi kejadian metastasis jauh menurut umur dan jenis kelamin penderita karsinoma tiroid tipe papiler

Umur (tahun)	Metastasis Jauh (n = 10)		Jumlah (%)
	Laki-laki (%)	Perempuan(%)	
1-10	0	0	0
11-20	0	0	0
21-30	0	0	0
31-40	0	0	0
41-50	1 (10)	4 (40)	5 (50)
51-60	0	1 (10)	1 (10)
61-70	2 (20)	2 (20)	4 (40)
> 70	0	0	0
Jumlah	3 (30)	7 (70)	10 (100)

Metastasis jauh yang terbanyak pada penelitian ini adalah metastasis ke tulang yaitu 5 penderita (50%). Metastasis ke tulang ini berupa metastasis ke kalvaria (3 penderita), metastasis ke tulang belakang (1 penderita), dan metastasis ke sternum (1 penderita). Metastasis jauh ke paru terjadi pada 4 penderita (40%), sedangkan metastasis ke hepar terjadi pada 1 penderita (10 %).

Tabel 5.1.3 Distribusi lokasi metastasis jauh penderita karsinoma tiroid tipe papiler

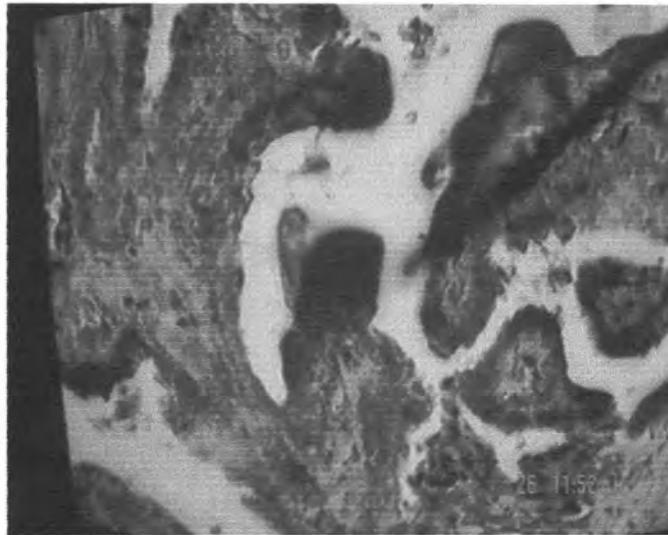
Lokasi metastasis	Frekuensi	Prosentase (%)
Tulang	5	50
Paru	4	40
Hepar	1	10
Total	10	100

Varian dari karsinoma tiroid tipe papiler pada penelitian ini terbanyak adalah papiler murni, yaitu 15 kasus (75 %), disusul dengan varian folikuler sebanyak 5 kasus (25 %).

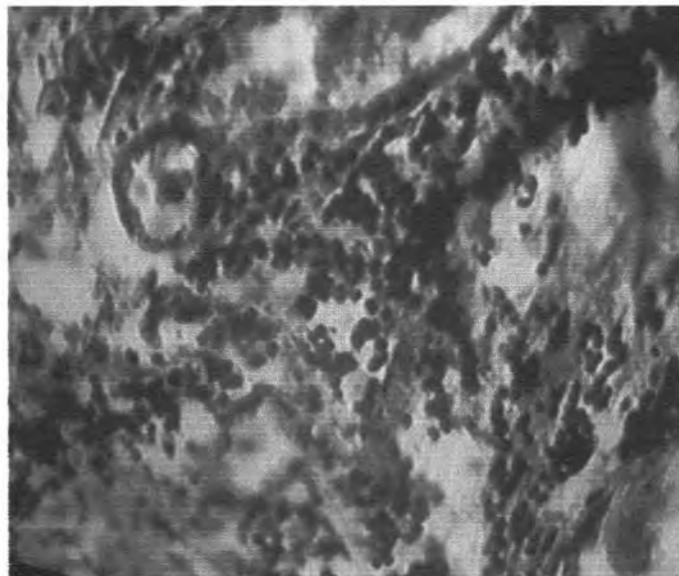
Tabel 5.1.4 Distribusi varian karsinoma tiroid tipe papiler

Varian	Frekuensi	Prosentase (%)
Papiler murni	15	75
Varian folikuler	5	25
Total	20	100

Hasil pemeriksaan imunohistokimia *Cathepsin D*



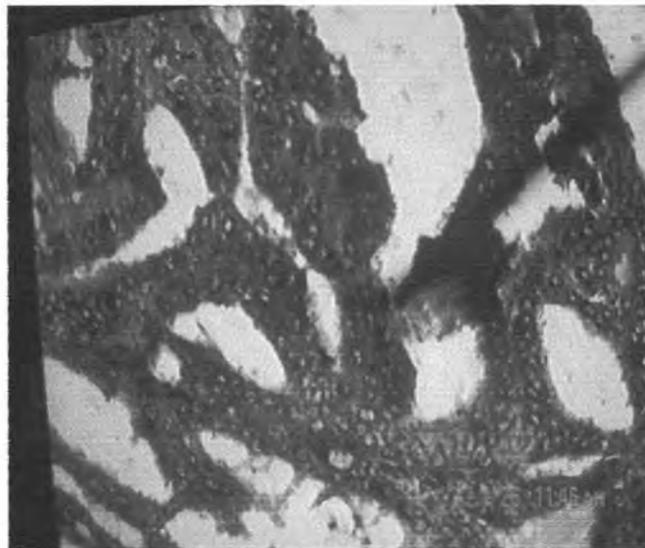
Gambar 1. Kontrol negatif : adenoma tiroid (Imunohistokimia, 200x)



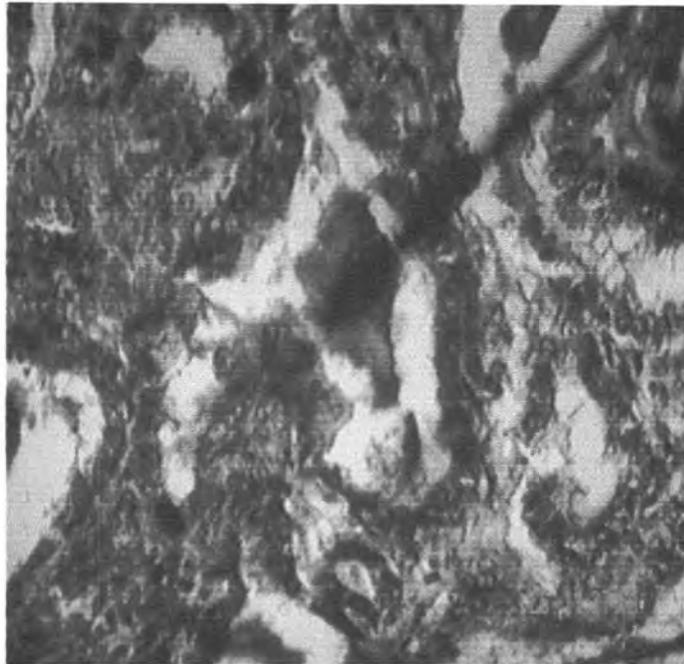
Gambar 2. Kontrol positif : Karsinoma payudara dengan estrogen reseptor positif. Ekspresi *cathepsin D* tercatat positif pada 100 % sel dengan intensitas kuat (3+) (Imunohistokimia, 200x)



Gambar 3. Karsinoma tiroid tipe papiler bernetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 80 % dengan intensitas kuat (3 +) (Imunohistokimia 200x)



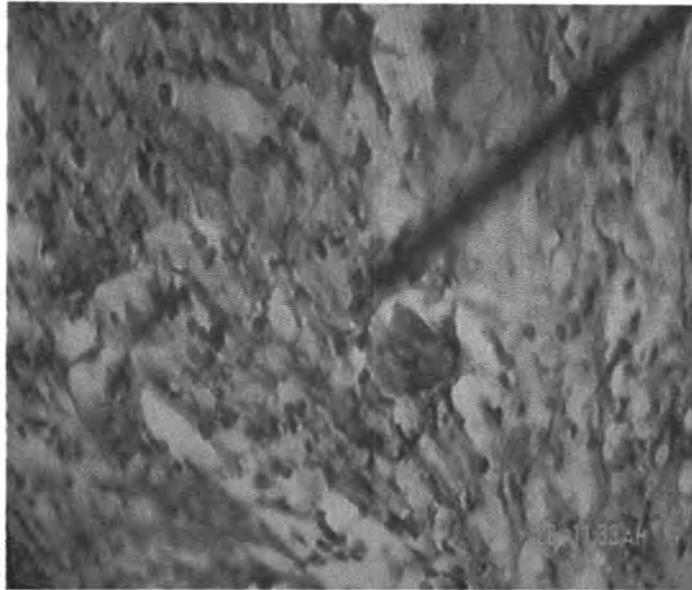
Gambar 4. Karsinoma tiroid tipe papiler bernetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 70 % dengan intensitas kuat (3 +) (Imunohistokimia 200x)



Gambar 5. Karsinoma tiroid tipe papiler bermetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 60 % dengan intensitas sedang (2+) (Imunohistokimia 200x)



Gambar 6. Karsinoma tiroid tipe papiler tidak bermetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 50 % dengan intensitas kuat (3+) (Imunohistokimia 200x)



Gambar 7. Karsinoma tiroid tipe papiler tidak bermetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 40 % dengan intensitas kuat (3 +) (Imunohistokimia 200x)



Gambar 8. . Karsinoma tiroid tipe papiler tidak bermetastasis jauh dengan ekspresi *cathepsin D*, sel tercat positif 10 % dengan intensitas kuat (3 +) (Imunohistokimia 200x)

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Dari seluruh sampel penelitian ($n = 20$), didapatkan semua kasus (100%) mempunyai ekspresi *cathepsin D*. Delapan kasus (40 %) tercatat pada 50-74% sel dengan intensitas kuat (3+), 6 kasus (30 %) tercatat pada 75 - 100% sel dengan intensitas kuat (3+), dan 5 kasus (25 %) tercatat pada 25-49 % sel dengan intensitas kuat (3+).

Tabel 5.2.1 Korelasi antara ekspresi *cathepsin D* dengan metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler

Skor Ekspresi Cathepsin D	Metastasis jauh		Total (%)
	Positif (%)	Negatif (%)	
12	7 (35)	1 (5)	8 (40)
9	2 (10)	3 (15)	5 (25)
6	1 (5)	4 (20)	5 (25)
4	0	1 (5)	1 (5)
3	0	1 (5)	1 (5)
0	0	0	0
Total	10 (50)	10 (50)	20 (100)

Rata-rata skor ekspresi *cathepsin D* pada penderita yang mengalami metastasis jauh adalah 10,8, dibandingkan dengan ekspresi *cathepsin D* pada penderita yang tidak mengalami metastasis jauh dengan nilai skor rata-rata 7. Dari hasil uji statistik menggunakan *chi-square* didapatkan nilai $p = 0,03$ yang berarti terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi *cathepsin D* dengan kejadian metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler.

Tabel 5.2.2. Distribusi kejadian metastasis jauh berdasarkan prosentase sel yang tercat positif dengan intensitas kuat (3+) terhadap cathepsin D pada karsinoma tiroid tipe papiler

Prosentase Sel Tercat positif dengan Intensitas kuat (3+)	Metastasis		Jumlah (%)
	Metastasis jauh (%)	Tidak Metastasis jauh (%)	
0 - 4	0	0	0
5 - 24	0	1 (5)	1 (5)
25 - 49	0	5 (25)	5 (25)
50 -74	5 (25)	3 (15)	8 (40)
75 - 100	5 (25)	1 (5)	6 (30)
Total	10 (50)	10 (50)	20 (100)

Pada kasus dengan metastasis jauh, 5 penderita (25%) didapatkan 50 – 74 % sel yang tercat positif dengan intensitas kuat (3+), dan 5 penderita (25 %) didapatkan 75 – 100 % sel yang tercat positif dengan intensitas kuat (3+). Pada kasus yang tidak bermetastasis jauh , 3 penderita (15 %) didapatkan 50 – 74 % sel yang tercat positif dengan intensitas kuat (3+), dan hanya 1 penderita (5%) didapatkan 75 – 100 % sel yang tercat positif dengan intensitas kuat (3+).

Untuk mengetahui seberapa besar resiko terjadinya metastasis, maka data yang diperoleh diolah dengan menggunakan tabel 2 X 2 (*Four fold table*) dan didapatkan hasil *odd ratio* sebesar 36,00 (dengan *confident interval* 95 % : 2,72 ; 476,30). Hasil *odd ratio* ini memberikan kesimpulan bahwa bila sel yang tercat positif > 60 % dengan intensitas kuat (+3) akan merupakan faktor resiko yang bermakna untuk terjadinya metastasis jauh.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Gambaran umum hasil penelitian

Pada penelitian ini diperiksa 20 blok parafin karsinoma tiroid tipe papiler, dibagi 2 kelompok, yaitu 10 sampel yang mengalami metastasis jauh dan 10 sampel yang tidak mengalami metastasis jauh. Usia terbanyak pada sampel penelitian ini adalah kelompok rentang usia 41 – 50 tahun (50 %), hal ini sesuai dengan kepustakaan bahwa insiden karsinoma tiroid tipe papiler lebih banyak pada usia yang lebih muda yaitu 30 – 50 tahun, sedangkan untuk tipe folikuler lebih banyak didapatkan pada usia yang lebih tua⁽²¹⁾. Usia kelompok penderita yang mengalami metastase jauh adalah antara 41 - 50 tahun (50 %), hal ini sesuai dengan kepustakaan bahwa 40 – 70 % karsinoma tiroid mengalami metastase jauh pada usia lebih dari 40 tahun⁽³⁾. Karsinoma tiroid tipe papiler 90 % bernetastasis melalui pembuluh limfe, hanya sekitar 10 % yang mengalami metastasis melalui pembuluh darah. Insiden metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler kurang lebih 10 – 15 %, dan ditemukannya metastasis jauh ini akan memperburuk prognosis⁽³⁾. Menurut Gardner (2000), 40 % kasus yang ditemukan adanya invasi pembuluh darah ekstratiroid, akan mengalami metastasis jauh, sedangkan bila tidak ditemukan invasi tumor pada pembuluh darah, hanya 4% yang mengalami metastasis jauh. Hal ini memberikan kesimpulan bahwa metastasis jauh pada karsinoma tiroid sebagian besar melalui hematogen^(19, 20).

Dari jenis kelamin, wanita didapatkan sebesar 80 %, sedangkan pada laki-laki sebesar 20%. Dari kepustakaan didapatkan bahwa insiden karsinoma tiroid tipe papiler lebih banyak pada wanita daripada laki-laki. Rasio berdasarkan jenis kelamin ini tergantung pada umur. Untuk kasus karsinoma tiroid usia kurang dari 19 tahun, rasio wanita dan laki-laki adalah 3,2 : 1, untuk usia 20 – 45 tahun rasio wanita dan laki-laki

adalah 3,6 : 1, sedangkan untuk usia diatas 45 tahun rasio wanita dan laki-laki adalah 2,8 : 1. Adanya perbedaan insiden ini dihubungkan dengan adanya pengaruh hormon reproduksi (estrogen) pada wanita.⁽³⁾ Angka rekurensi dan mortalitas pada penderita laki-laki akan meningkat bila kasus karsinoma tiroid ditemukan pada usia 40 – 50 tahun, sedangkan pada wanita angka rekurensi dan mortalitas meningkat secara dramatis setelah usia diatas 50 tahun. Perbedaan angka rekurensi dan mortalitas ini disebabkan karena pada wanita terjadi perubahan hormonal pada saat menopause⁽³⁾.

Pada kasus dengan metastasis didapatkan 50 % terjadi metastasis ke tulang, dan 40 % terjadi metastasis ke paru. Dari kepustakaan didapatkan bahwa karsinoma tiroid sebagian besar (71 %) akan bermetastasis jauh ke paru. Dari seluruh metastasis paru ini hampir 90 % kasus merupakan metastasis tunggal di paru, sedangkan 10% merupakan metastasis ganda yaitu selain ke paru juga ke tulang dan lain-lain. Metastasis ke tulang merupakan 20 % kasus dari metastasis jauh karsinoma tiroid tipe papiler, usia terjadinya metastasis berkisar antara usia 40- 60 tahun, dan 75 % merupakan kasus metastasis tunggal di tulang. Lokasi metastasis jauh ke tulang adalah : kosta (33,3 %), kalvaria (23,8%), vertebra (19%), pelvis (14,3%), klavikula (9,5%), humerus (4,7 %), dan femur (4,7 %). Metastasis ke tulang ini umumnya memberikan respon yang baik dengan terapi ablasi I¹³¹ radioaktif dengan dosis 90 – 880 *millicurie*. Kasus metastasis jauh karsinoma tiroid tipe papiler yang jarang terjadi tetapi pernah dilaporkan adalah metastasis ke mediastinum (10 %), hepar (1 %), saraf pusat (3%), kulit (1%), payudara (1 %), dan ginjal / adrenal (1 %). Penderita yang mengalami metastasis ke saraf pusat terjadi secara hematogen, ini dibuktikan dengan ditemukannya invasi pembuluh darah pada pemeriksaan patologi. Kasus metastasis ke saraf pusat ini juga mengalami metastasis ke paru atau tulang karena kedua organ tersebut merupakan lokasi tersering pada metastasis karsinoma tiroid tipe papiler^(44,45).

Pada penelitian ini didapatkan 3 kasus metastasis jauh ke tulang kalvaria. Dari kepustakaan disebutkan bahwa metastasis ke kalvaria jarang terjadi, dan bila terjadi umumnya pada karsinoma tiroid tipe folikuler. Lesi metastasis pada kalvaria ini sifatnya hipervaskuler dan osteolitik. Periode terjadinya metastasis jauh ke tulang kalvaria ini umumnya terjadi setelah 23 tahun sejak karsinoma tiroid ditemukan, walaupun pernah dilaporkan terjadinya metastasis setelah 2 tahun ditemukan karsinoma tiroid tipe papiler^(44,45). Perbedaan dari kepustakaan ini disebabkan pada penelitian ini sampel yang diambil adalah penderita yang masih bisa dilakukan operasi, sedangkan kasus yang tidak dioperasi tidak dimasukkan kedalam populasi penelitian.

Pada penelitian ini didapatkan 2 varian karsinoma tiroid tipe papiler, yaitu papiler murni / klasik 15 kasus (25%), dan varian folikuler 5 kasus (75%). Dari kepustakaan disebutkan bahwa 50 % karsinoma tiroid tipe papiler mempunyai varian folikuler, sedangkan untuk papiler murni adalah 20 %. Varian lain yang lebih jarang dari karsinoma tiroid tipe papiler adalah : *encapsulated tumour* (10%), *hyalinizing trabecular tumour* (2%), *diffuse sclerosis* (2%), *cribiform-morular* (2 %), *tall cell / columnar cell* (8%), dan *hürthle (oxyphylic) cell papillary carcinoma* (6%)^(3). Pada penelitian Khan (1998) didapatkan sebaliknya, yaitu varian klasik sebesar 57 %, varian folikuler sebesar 20 %, varian *tall / collumner* 8 %, *oxyphil* 6%, *diffuse sclerosing* 3%, dan *dedifferentiated* 6%⁽⁴⁷⁾. Gambaran mikroskopik dari varian folikuler karsinoma tiroid tipe papiler menunjukkan arsitektur folikuler tetapi mempunyai karakteristik inti sel seperti karsinoma tipe papiler klasik. Dari kedua tipe ini tidak didapatkan perbedaan pola agresifitas dan prognosis. *Hyalinizing trabecular tumour* mempunyai karakteristik dengan ditemukannya *elongated spindle-shaped cells*, gambaran *hyaline* sitoplasma, dan *stromal hyaline fibrosis*. Varian *diffuse sclerosis* mempunyai karakteristik adanya *squamous metaplasia*, dan banyak ditemukannya *psammoma bodies*. Varian *cribiform-morular* mempunyai karakteristik

dengan ditemukannya bentuk campuran *cribiform*, folikuler, papiler, trabekuler, solid, dengan beberapa area *morular* atau *squamoid*. Varian *tall cell* mempunyai karakteristik gambaran sel dengan perbandingan tinggi : lebar adalah lebih dari 3 : 1 dengan arsitektur papiler kompleks dan fokal nekrosis. Varian *collumnar* hampir sama dengan gambaran varian *tall cell*, tetapi jumlah sel lebih padat dengan gambaran pseudostratifikasi. Varian *hürthle (oxyphylic) cell* mempunyai karakteristik dengan ditemukannya inti sel yang lebih pleomorfik, lebih besar dan hiperkromatik⁽³⁾.

Varian folikuler, *encapsulated tumour*, *hyalinizing trabecular tumour*, *diffuse sclerosis*, dan *cribiform-morular* mempunyai pola agresifitas dan prognosis yang sama dengan varian papiler klasik / murni. Sedangkan varian *tall cell*, *collumnar cell*, dan *hürthle cell papillary carcinoma* mempunyai sifat yang lebih agresif dengan prognosis yang lebih buruk⁽³⁾.

Pada penelitian ini ditemukan 1 penderita karsinoma tiroid dengan usia 21 tahun dan tidak ditemukan metastasis jauh. Dari kepustakaan didapatkan bahwa penderita karsinoma tiroid berdeferensiasi baik yang terjadi pada usia muda umumnya adalah tipe papiler dan mempunyai prognosis yang sangat baik, dengan daya tahan hidup 10 tahun sebesar 100 %⁽³⁾.

6.2 Korelasi antara ekspresi *cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler.

Pada penelitian ini 20 penderita (100 %) memberikan hasil positif pada pemeriksaan imunohistokimia *cathepsin D*. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* pada sel kanker ini disebabkan karena adanya peningkatan ekspresi gen *cathepsin D* dan adanya proses perubahan pada prekursor protein akibat mutasi⁽²⁴⁾. Dari hasil uji *chi-square* didapatkan hasil $p=0,03$ yang artinya terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi

cathepsin D dengan terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler. Dengan menggunakan tabel 2X2 (*Four fold table*) didapatkan hasil *odd ratio* sebesar 36,00 (*range* 2,72 ; 476,30 dengan *confident interval* 95 %). Hasil *odd ratio* ini memberikan kesimpulan bahwa bila sel yang tercat positif > 60 % dengan intensitas kuat (+3) merupakan faktor resiko yang sangat bermakna untuk terjadinya terjadinya metastasis jauh.

Penelitian Kraimps (1995) pada 32 sampel karsinoma tiroid (semua tipe), menyatakan bahwa seluruh sampel (100%) memberikan hasil yang positif terhadap pemeriksaan *cathepsin D*. Penelitian Kraimps ini juga menyatakan bahwa terdapat peningkatan ekspresi *cathepsin D* bila dibandingkan dengan jaringan tiroid normal, dan tidak ada perbedaan yang bermakna terhadap tipe histologi. Terdapat perbedaan ekspresi *cathepsin D* berdasarkan ukuran karsinoma tiroid yaitu *cathepsin D* terekspresi lebih tinggi pada T4 dibandingkan dengan T1, T2 atau T3 Peningkatan ekspresi *cathepsin D* ini dihubungkan dengan transformasi neoplasma pada karsinoma tiroid dan memberikan potensial prognosis berdasarkan ukuran tumor. Penelitian Kraimps ini menggunakan preparat baru dari hasil operasi dengan metode *immunoradiometric assay* menggunakan 2 monoklonal antibodi dan tehnik *frozen section (liquid nitrogen)*.⁽¹¹⁾

Pada penelitian Metaye (1993) memberikan kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi reseptor estrogen pada karsinoma tiroid dengan jaringan tiroid normal, hal ini memberikan kesimpulan bahwa pada jaringan tiroid aktifitas *cathepsin D* tidak diregulasi oleh hormon estrogen tetapi merupakan petunjuk adanya peningkatan aktifitas enzim protease selama proses invasi dan metastasis. Pada karsinoma payudara dengan ekspresi reseptor estrogen yang tinggi akan memperburuk prognosis, sebab rangsangan hormon estrogen dan *growth factor* akan menyebabkan peningkatan inisiasi transkripsi *mRNA* dari *cathepsin D*⁽³⁰⁾.

Pada penelitian lain dari Metaye (1997), juga membuktikan bahwa terdapat ekspresi *cathepsin D* pada 35 sampel (100 %) dari semua tipe karsinoma tiroid. Terdapat peningkatan yang signifikan dari ekspresi *cathepsin D* pada semua tipe karsinoma tiroid bila dibandingkan dengan adenoma tiroid dan jaringan tiroid normal. Bentuk aktif dari *cathepsin D* yang terbanyak pada karsinoma tiroid adalah 31 kDa, terutama pada tipe papiler. Dominannya bentuk 31 kDa ini memberikan kesimpulan bahwa tidak hanya sekresi yang meningkat tetapi potensi aktifitas *cathepsin D* juga meningkat, sebab bentuk 31 kDa ini merupakan *isoform* yang paling aktif diantara bentuk *cathepsin D* yang lain ⁽²⁹⁾.

Holm (1995) melakukan penelitian terhadap ekspresi *cathepsin D* pada karsinoma tiroid tipe meduler. Metode imunohistokimia yang digunakan sama dengan penelitian karya akhir ini, yaitu menggunakan metode *avidin biotin peroxidase complex (ABC)*. Dari pemeriksaan terhadap 44 sampel karsinoma tiroid tipe meduler didapatkan 14 kasus (32%) positif terhadap *cathepsin D*, sedangkan 17 kasus (47%) metastasis kelenjar getah bening juga positif terhadap *cathepsin D*. Kesimpulan dari penelitian Holm ini adalah tidak adanya korelasi yang signifikan antara ekspresi *cathepsin D* dengan potensi metastasis kelenjar getah bening, potensi metastasis jauh, dan angka *survival* pada karsinoma tiroid tipe meduler. Penelitian Holm ini menggunakan sampel blok parafin karsinoma tiroid tipe meduler yang tersimpan antara tahun 1961 sampai tahun 1992 ⁽¹²⁾. Hasil penelitian Holm ini tidak sesuai dengan hasil penelitian Metaye (1995) dan Kraimps (1995), kemungkinan disebabkan perbedaan lama penyimpanan blok parafin. Penelitian Kraimps dan Metaye menggunakan jaringan baru, sedangkan Holm menggunakan blok parafin yang sudah tersimpan antara 3 - 34 tahun.

Cathepsin D mempunyai peran fisiologis yaitu degradasi protein intraseluler. Selain itu juga berperan dalam proses *turn over* sel, repair membran plasma, inaktivasi organisme patogen, aktivasi *procathepsin D* (autoaktivasi), dan proses *loading* dari antigen ke

molekul *MHC*. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* ini mempunyai banyak peran dalam pertumbuhan sel neoplasma, yaitu : meningkatkan degradasi matriks ekstraseluler, merangsang angiogenesis, menginduksi pertumbuhan invasif dari fibroblas, dan menghambat apoptosis sel tumor^(23, 24, 25).

Hasil degradasi protein ini digunakan untuk suplai asam amino sel kanker itu sendiri. Peningkatan kemampuan degradasi protein pada sel kanker dibuktikan dengan ditemukannya vesikel asam intraseluler (*LAVs*), dimana aktifitas heterofagosom ini tidak ditemukan pada sel normal. Selain itu peningkatan kemampuan degradasi protein juga dibuktikan dengan ditemukannya peningkatan sekresi *cathepsin D* ke ekstraseluler, sehingga kemampuan melakukan degradasi matriks ekstraseluler meningkat⁽²⁵⁾.

Cathepsin D mempunyai kemampuan untuk inaktivasi *IGF-binding protein 3*, suatu molekul yang berfungsi menghambat pertumbuhan sel kanker (*growth inhibitor*). *Cathepsin D* juga mempunyai kemampuan untuk melakukan aktivasi beberapa *growth factor* dan sitokin yang berada di matriks ekstraseluler (*ECM*), seperti *pro TGFβ* yang berfungsi melakukan fasilitasi terhadap invasi sel kanker, dan *fibroblast growth factor (FGF)* yang mempunyai aktivitas sebagai *growth factor* dan stimulasi angiogenesis⁽²⁷⁾. Selain itu *Cathepsin D* mempunyai kemampuan untuk melakukan aktivasi *procathepsin B*, *cathepsin B*, dan *pro urokinase plasminogen activators*. Berchem (2002) dalam penelitiannya menyatakan bahwa peningkatan ekspresi *cathepsin D* menyebabkan penurunan proses *apoptosis* sampai 80 %, hal ini memberikan kesempatan sel tumor tetap tumbuh dan berkembang⁽²⁷⁾. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* pada solid tumor akan mempercepat proses metastasis, mempercepat proliferasi sel kanker primer dan metastasis, meningkatkan resiko rekurensi, dan memperpendek *disease free survival*^(25, 26, 27).

Procatahepsin D selain sebagai prekursor dari *cathepsin D*, juga berperan sebagai *autocrine mitogen*, yaitu mampu berinteraksi dengan reseptor membran sel di sekitar sel

kanker untuk merangsang *growth factor*, sehingga mempunyai potensi proliferasi yang lebih tinggi. *Procathepsin D* juga berperan dalam pembentukan metastasis sel kanker. Sifat mitogenik *procathepsin D* ini disebabkan karena : aktifitas proteolitik saat ekspose dengan suasana asam, adanya *sacharidic moieties (phosphorilated)*, adanya struktur primer yang berinteraksi dengan molekul terlarut dan tidak terlarut (*membrane bounded*), juga oleh karena mekanisme yang belum diketahui^(24, 25, 26).

Beberapa kanker ganas solid yang sudah terbukti terdapat peningkatan ekspresi *cathepsin D* adalah : kanker kulit (melanoma), paru, gaster, kolon, ginjal, payudara, ovarium, kandung kemih, pankreas, syaraf, dan kanker hati. Pada keganasan, *cathepsin D* berperan dalam proses metastasis dengan cara degradasi matriks ekstraseluler, menginduksi angiogenesis, dan menghambat apoptosis, aktivasi *growth factor*, dan inaktivasi *growth inhibitor*. Pada kanker payudara peningkatan ekspresi *cathepsin D* dapat dijadikan faktor prognostik independen⁽¹¹⁾.

6.3. Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan imunohistokimia *cathepsin D*

Pemeriksaan imunohistokimia adalah salah satu prosedur pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi adanya antigen tertentu pada potongan jaringan. Dasar pemeriksaan ini adalah adanya reaksi antigen antibodi dengan menggunakan antibodi yang sudah diberi label⁽³⁶⁻³⁷⁾.

Preparasi jaringan memegang peranan penting dalam pemeriksaan imunohistokimia ini. Proses preparasi jaringan meliputi : fiksasi jaringan, dehidrasi, pembuatan parafin blok, pemotongan jaringan dengan mikrotom, deparafinisasi, *antigen retrieval*, dan pengecatan imunohistokimia. Kesalahan salah satu dari langkah ini akan memberikan hasil pemeriksaan yang kurang baik.

Fiksasi jaringan dengan segera dan adekuat sangat esensial untuk mempertahankan morfologi jaringan. Dalam proses fiksasi jaringan masih banyak faktor yang mempengaruhi kualitas dari fiksasi itu, meliputi : pH, suhu, daya tembus cairan fiksasi, volume cairan fiksasi, konsentrasi cairan fiksasi dan lamanya proses fiksasi. Fiksasi yang tidak adekuat atau terlalu lama akan menurunkan kemampuan antigen dalam mengikat antibodi. Fiksasi atau pengawetan jaringan bertujuan untuk menghentikan dengan segera proses biokimia yang terjadi didalam sel. Jaringan yang masih segar dari operasi harus segera dimasukkan ke bahan fiksasi, keterlambatan fiksasi jaringan akan menyebabkan dekomposisi jaringan sehingga merusak morfologi jaringan dan antigen sel. Selain itu fiksasi jaringan juga berfungsi untuk menambah afinitas protoplasma terhadap pewarnaan, dan mempertahankan sel dari larutan hipotonis dan hipertonis^(36, 37).

Fiksasi formalin umumnya lebih baik dalam mempertahankan antigen dibandingkan dengan bahan fiksasi yang lain. Cairan fiksasi yang digunakan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo selama ini adalah larutan formalin *buffer* yang terdiri atas *formaldehid* 38-40%, air suling, sodium hidrogen fosfat dan disodium hidrogen fosfat. Waktu optimum fiksasi menggunakan formalin tergantung ukuran blok jaringan dan jenis jaringan. Fiksasi antara 18 sampai 24 jam cukup optimal untuk mempertahankan jaringan. Fiksasi yang terlalu singkat menyebabkan timbulnya perubahan warna ditepi jaringan dan tidak ada sinyal warna ditengah jaringan. Fiksasi yang terlalu lama akan menyebabkan penutupan seluruh epitop antigen sehingga antigen tidak terdeteksi dengan antibodi, walaupun menggunakan tehnik *antigen retrieval*. Penggunaan formalin untuk fiksasi harus berhati-hati, sebab formalin dapat menimbulkan reaksi alergi dikulit yang kuat (dermatitis kontak), dan bersifat karsinogenik. Iritasi nasal, kornea, dan paru juga bisa terjadi akibat rangsangan gas formalin^(36, 37, 38).

Fiksasi menggunakan formalin dapat mengakibatkan terjadinya perubahan kimia pada antigen yang ada dalam jaringan. Perubahan kimia yang terjadi dinamakan *cross-link*, yaitu berupa jembatan metilen (*methylene bridge*) antara formalin dan antigen. Adanya *cross-link* ini mengakibatkan antigen tertutup sehingga tidak terdeteksi oleh antibodi, hal ini menyebabkan pengecatan atau pemeriksaan imunohistokimia akan memberikan hasil yang kurang sempurna dan menimbulkan kesalahan dalam interpretasi hasil pemeriksaan^(37,38).

Teknik antigen *retrieval* digunakan untuk menghilangkan *cross link* ini sehingga antigen dapat terbuka dan mempermudah penetrasi antibodi. Teknik *antigen retrieval* ini dapat mengembalikan imunoreaktivitas dari antigen jaringan dengan cara *hydrolisis cross-link methylene bridge* yang terbentuk saat fiksasi formalin. Teknik *antigen retrieval* yang dikenal dengan teknik *Antigen Retrieval Immunohistochemistry* (AR-IHC), mempunyai beberapa metode yaitu: *Heat induced epitope retrieval* (*HIER*), dan *Proteolytic induced epitope retrieval* (*PIER*). Metode *HIER* adalah metode pemanasan *microwave* (pemanasan suhu tinggi 120°C) atau *pressure techniques* menggunakan *pressure cooker* dalam cairan *retrieval* (*Tris / EDTA* atau *citrat buffer*). Metode *PIER* menggunakan enzim proteolitik (*proteinase k*, *trypsin*, *chymotrypsin*, *pepsin*, atau *pronase*). Kerugian teknik *PIER* ini adalah enzim dapat merusak epitop antigen dan morfologi jaringan, selain itu metode ini membutuhkan waktu inkubasi dan ketepatan konsentrasi enzim. Kombinasi teknik *PIER* dan *HIER* dapat digunakan sebagai alternatif bila semua metode *antigen retrieval* gagal mengembalikan imunoreaktivitas antigen. Proses *antigen retrieval* cukup dilakukan selama 20 menit. Proses yang terlalu singkat akan menghasilkan pengecatan yang lemah, sedangkan bila terlalu lama akan menyebabkan perubahan warna non spesifik dari latar belakang potongan jaringan. Pada penelitian ini digunakan teknik *antigen retrieval* metode

HIER karena relatif lebih singkat, dan tidak merusak antigen dan morfologi jaringan^(39,40,41).

Setelah dilakukan fiksasi, perlu dilakukan dehidrasi. Dehidrasi bertujuan membuang air dan menggantinya dengan larutan organik. Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan ke dalam alkohol dengan beberapa konsentrasi. Alkohol bersifat hidrofobik, sehingga dapat menyerap cairan di dalam jaringan tanpa merusak struktur jaringan. Proses dehidrasi yang tidak adekuat dapat menyebabkan denaturasi protein oleh air, sehingga akan merusak struktur jaringan^(36, 37).

Blok parafin merupakan salah satu cara pengawetan jaringan dimana kita dapat memperoleh jaringan untuk bahan pemeriksaan histopatologi yang ukurannya lebih besar, dapat bertahan lama, antigen yang terkandung dalam jaringan dapat diselamatkan, dan penyimpanannya relatif mudah. Pembuatan blok parafin juga bertujuan agar pemotongan jaringan dengan mikrotom menjadi lebih mudah. Beberapa antigen tertentu tidak dapat bertahan dengan proses fiksasi dan pembuatan parafin blok. Dalam hal ini dapat digunakan teknik potong beku (*frozen section*) untuk pengecatan imunohistokimia. Pemeriksaan potong beku lebih baik dalam mempertahankan fungsi enzim dan antigen jaringan dibandingkan dengan pembuatan parafin blok. Kerugian dari teknik potong beku adalah : morfologi jaringan yang kurang baik, resolusi yang buruk pada pembesaran yang tinggi dari mikroskop, dibutuhkan penyimpanan yang khusus, teknik pemotongan yang lebih sulit dan lebih tebal dengan mikrotom karena kristal es tidak terpotong, dan keterbatasan preparat untuk disimpan lebih lama^(40, 41).

Deparafinisasi dilakukan setelah pemotongan jaringan. Deparafinisasi bertujuan untuk membuang seluruh parafin yang ada pada jaringan. Deparafinisasi yang kurang baik akan menghasilkan pengecatan yang kurang baik^(38, 40).

Terdapat 2 teknik pengecatan untuk pemeriksaan imunohistokimia, yaitu metode langsung (*direct method*) dan metode tidak langsung (*indirect method*). Metode langsung menggunakan satu macam antibodi yang sudah dilakukan labelisasi untuk mendeteksi suatu antigen. Proses metode langsung ini tidak membutuhkan waktu yang lama, tetapi tidak sensitif karena hanya memberikan sinyal amplifikasi yang kecil. Saat ini metode langsung sudah banyak ditinggalkan seiring dengan dikembangkannya metode tidak langsung. Metode tidak langsung adalah teknik pengecatan imunohistokimia yang menggunakan dua antibodi, yaitu antibodi primer dan sekunder. Antibodi primer adalah antibodi yang tidak dilabelisasi, dan akan melekat langsung dengan antigen, sedangkan antibodi sekunder adalah antibodi yang sudah dilabelisasi, dan akan melekat pada antibodi primer. Dengan teknik labelisasi enzimatik dan pemberian substrat *chromogen*, akan memberikan perubahan warna. Metode tidak langsung ini lebih sensitif dalam mendeteksi antigen karena mempunyai sinyal amplifikasi yang kuat akibat reaksi antigen dengan antibodi. Antibodi sekunder dapat dilakukan labelisasi menggunakan *fluorescent dye* (FITC, *rhodamin*, atau *Texas red*), teknik ini disebut *indirect immunofluorescent method*. Labelisasi antibodi sekunder juga bisa dilakukan dengan pemberian enzim peroksidase, *alkaline phosphatase*, atau glukose oksidase sehingga disebut sebagai teknik *indirect immunoenzyme method*. Pada beberapa jaringan terdapat biotin endogen yang dapat menyebabkan timbulnya ikatan kompleks avidin – biotin, sehingga menyebabkan perubahan warna pada latar belakang preparat. Untuk mengatasi hal ini dapat diberikan *dual endogenous enzyme block*, yang akan menutup aktifitas enzim yang tidak diperlukan^(39, 40, 41).

Inkubasi pengecatan imunohistokimia ini memerlukan waktu satu malam, inkubasi ini memberikan kesempatan seluruh antigen dapat berikatan dengan antibodi. Pemberian peroksidase (H_2O_2) bertujuan menekan aktivitas peroksidase endogen, dengan demikian

akan mengurangi pewarnaan pada latar belakang jaringan. Kualitas peroksidase yang kurang baik akan menyebabkan hasil pewarnaan menjadi kurang sempurna. Pemilihan bahan *chromogen* untuk memberikan perubahan warna harus sesuai dengan label *enzym* yang dipakai. Pada penelitian ini dipakai *enzym Horseradish peroksidase (HRP)* dan substrat *diaminobenzidine (DAB)*, karena bahan ini memberikan intensitas pewarnaan yang baik dan permanen. Kerugian dari bahan *chromogen* ini adalah adanya aktivitas *peroksidase* endogen menyebabkan hasil pewarnaan menjadi *false positif*. Teknik pengecatan imunohistokimia pada penelitian ini menggunakan metode tidak langsung, yang lebih baik dalam mengidentifikasi antigen dibandingkan dengan metode langsung^(39,40,41).

Pemeriksaan imunohistokimia pada umumnya juga dapat dilakukan pada sediaan yang didapat dengan cara biopsi aspirasi jarum halus (*fine needle aspiration biopsy*). Pengecatan ini dapat dilakukan bila perubahan warna yang terjadi terdapat pada inti sel atau sitoplasma. Saggiorato (2005) melakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk ekspresi *galectin-3*, *HBME-1*, dan *cytokeratin-19* pada folikuler neoplasma tiroid yang diambil dengan cara biopsi aspirasi jarum halus (*FNAB*). Dari analisis statistik penelitian Saggiorato ini didapatkan bahwa pemeriksaan imunohistokimia pada preparat biopsi aspirasi jarum halus mempunyai sensitifitas 92 % dan spesifisitas 94% untuk membedakan adenoma folikuler dan karsinoma folikuler⁽⁴⁸⁾. Pada pengecatan imunohistokimia *cathepsin D* terjadi perubahan warna kecoklatan pada sitoplasma. Bila dari biopsi aspirasi jarum halus didapatkan sel lebih dari 100 maka penilaian skor bisa dilakukan untuk menilai prosentase sel yang tercat dan intensitasnya. Dengan adanya penilaian ekspresi *cathepsin D* pra operasi maka diharapkan dapat ditentukan prognosis karsinoma tiroid tipe papiler, dengan demikian total tiroidektomi diperlukan bila ekspresi *cathepsin D* tinggi walaupun prognosis faktor *AMES* baik.

Dari pembahasan mengenai proses peaparasi jaringan sampai pengecatan, terlihat bahwa banyak sekali faktor-faktor yang dapat menyebabkan hasil pengecatan imunohistokimia menjadi kurang sempurna. Untuk hasil pengecatan yang baik maka diperlukan bahan preparat jaringan yang baik, bahan-bahan pengecatan yang baik, standarisasi kerja, dan tenaga yang terampil dan khusus dibidang ini.

BAB 7

RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian korelasi ekspresi *cathepsin D* dengan resiko terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler. Hipotesis yang akan diuji pada penelitian ini adalah apakah peningkatan ekspresi *cathepsin D* akan menyebabkan peningkatan resiko terjadinya metastasis. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli 2007 hingga November 2007 di bagian Ilmu Bedah dan bagian Patologi anatomi Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo. Surabaya.

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian observasional analitik dengan pendekatan *case control*. Jumlah sampel yang digunakan adalah 20, dibagi menjadi 2 kelompok yaitu 10 sampel kasus karsinoma tiroid tipe papiler yang mengalami metastasis jauh dan 10 sampel kasus karsinoma tiroid yang tidak mengalami metastasis jauh. Seluruh sampel dilakukan pengecatan imunohistokimia untuk melihat ekspresi *cathepsin D*. Data yang diperoleh dilakukan uji statistik menggunakan uji *chi-square* untuk melihat adanya korelasi antara ekspresi *cathepsin D* dengan kejadian metastasis, dan data juga diolah dengan tabel 2 X 2 (*four fold table*) untuk mengetahui apakah peningkatan ekspresi *cathepsin D* merupakan faktor resiko untuk terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler (*odd ratio*).

Hasil penelitian menunjukkan usia terbanyak adalah pada kelompok 41 – 50 tahun (50 %). Jenis kelamin wanita lebih banyak daripada laki-laki dengan rasio 4:1. Pada kasus dengan metastasis, 50 % terjadi pada kelompok usia 41 – 50 tahun, sedangkan untuk kelompok umur 61 – 70 tahun, kejadian metastasis sebesar 40%. Jenis varian terbanyak dari karsinoma tiroid adalah varian klasik / murni (75%). Selanjutnya adalah varian folikuler (25%). Lokasi metastasis terbanyak adalah ke tulang (50 %), selanjutnya ke paru

(40 %), dan ke hepar (10 %). Varian karsinoma tiroid yang terbanyak pada penelitian ini 75% berupa papiler murni / klasik, sedangkan varian folikuler sebesar 25 %. Dari pemeriksaan imunohistokimia didapatkan seluruh preparat (100 %) menunjukkan hasil ekspresi *cathepsin D* yang positif. Nilai skor rata-rata untuk ekspresi *cathepsin D* pada kasus yang mengalami metastasis adalah 10,8, sedangkan nilai skor rata-rata untuk ekspresi *cathepsin D* pada kasus yang tidak mengalami metastasis adalah 7. Dari uji statistik menggunakan *chi-square*, didapatkan hasil $p=0,03$ yang menunjukkan adanya korelasi yang bermakna antara ekspresi *cathepsin D* dengan terjadinya metastasis pada karsinoma tiroid tipe papiler. Dengan menggunakan tabel 2X2 (*four fold table*) didapatkan bahwa bila sel yang tercat positif > 60 % dengan intensitas kuat (+3) merupakan faktor resiko yang bermakna untuk terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler.

BAB 8

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

- Ekspresi *cathepsin D* didapatkan pada karsinoma tiroid tipe papiler
- Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi *cathepsin D* dengan terjadinya metastasis jauh pada karsinoma tiroid tipe papiler.
- Pada sel yang tercat positif > 60 % dengan intensitas kuat (+3) dengan *cathepsin D*, merupakan faktor resiko yang bermakna untuk terjadinya metastasis jauh.

SARAN

- Ekspresi *cathepsin D* dapat digunakan untuk menentukan prognosis pada karsinoma tiroid tipe papiler. Peningkatan ekspresi *cathepsin D* akan menyebabkan peningkatan resiko terjadinya metastasis jauh.
- Diharapkan adanya penelitian ekspresi *cathepsin D* pada karsinoma tiroid tipe papiler dengan preparat yang didapatkan dengan cara biopsi aspirasi jarum halus.
- Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut mengenai terapi penghambat *cathepsin D* terhadap pengaruhnya pada pertumbuhan karsinoma tiroid tipe papiler.

KEPUSTAKAAN

1. Howard RJ. Tumours of the thyroid and parathyroid glands. In : Watkinson JC, Gaze MN, Wilson JA, editors. *Stell & Maran's head & neck surgery*, 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000. p.459-85.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistic. *CA Cancer J Clin* 2005 ; 55 : 74-108.
3. Roy B. Kenneth D. Cancer of the thyroid gland. In : Harrison LB, Session RB, Hong WK, editors. *Head and neck cancer, A Multidisciplinary approach*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.715-25.
4. Rouxel A, Hejblum G, Bernier MO. Prognosis factors associated with the survival of patients developing loco-regional recurrences of differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 ; 89: 5362-8.
5. Ellis LM, Radinsky R, Fidler IJ. Recent advances in the biology of cancer invasion and metastasis. In : Bland KI, Daly JM, Karakausis CP, editors. *Surgical oncology, contemporary principles & practice*. New York: Mc Graw-Hill; 2000. p.101-16.
6. Brunner WN, Stephen RW, Dano K. Control of invasion and metastasis. In : Harris JR, Lippman ME, Morrow M, editors. *Disease of the breast*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.367-73.
7. Levine EA, Prasad JL. Oncology. In : O'leary JP, editors. *The physiologic basis of surgery*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. p.202.
8. Devita VT, Samuel H, Rosenberg SA. *Cancer principle & practice of oncology*. 6th ed.. Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins; 2001.p.123-36.
9. Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Arch Surg* 1998; 133: 419-24.

10. Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control*; 2000; 7: 229-39.
11. Kraimps JL, Metaye T, Millet C, Margerit D, Ingrand P, Goujon JM, et al. Cathepsin D in normal and neoplastic thyroid tissue. *J Surgery* 1995 Dec; 118: 1036-9.
12. Holm R, Hoie J, Kaalhus O, Nesland JM. Immunohistochemical detection of nm23 / NDP kinase and cathepsin D in medullary carcinoma of the thyroid gland. *Virchow Arch* 1995 Mar; 427: 289-94.
13. Schlumberger MJ, Papillary and follicular thyroid carcinoma. *NEJM*. 1998; 333: 297-306.
14. Reksoprawiro S. Karsinoma Troid: Deteksi dini dan penanganannya. *Warta Ikabi* 1997; 10: 140-54.
15. Weigel RJ. Thyroid in: Norton JA, Bollinger R, Chang AE, editors. *Surgery. Basic Science and Clinical Evidence*. New York: Springer; 2001.p.885-92.
16. Sjamsuhidajat R, Jong DJ. Buku ajar ilmu bedah. Jakarta: EGC; 1997. p.936-41.
17. Reksoprawiro S. Frequency of thyroid carcinoma in 572 thyroidectomies in non toxic nodular goiter. *Folia Medica Indonesiana*. 1999 ; 35 : 1-4,
18. Lebolleaux S, Rubino C, Baudin E, Caillou B, Hartl DM, Bidart JM, Travagli JP, Schlumberger M. Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastase and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5723-9.
19. Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. Skip metastases in thyroid cancer leaping the central lymph node compartment. *Arch Surg* 2004; 139: 43-5.
20. Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000; 126: 309-12.

21. Thyroid. In: American joint committee on cancer.: AJCC cancer staging manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.p. 77-87.
22. Pai SI, Lin YY, Macaes B, Hung CF. Gene therapy, prospect of RNA interference therapy. may 2007 (cited 2007 jun 6). Available from : URL:HYPERLINK [//www.nature.com/gt/journal/v13/n6/images/3302694fa.html](http://www.nature.com/gt/journal/v13/n6/images/3302694fa.html).
23. Pertanen S. Cathepsin D deficiency – molecular and cellular mechanism of neurodegeneration (disertasi).- Helsinki : Institute of biomedicine / biochemistry Helsinki Univ. ; 2006.
24. Fusek M, Vetvicka V. Dual role of cathepsin D : Ligand and protease. J Biomed 2005; 149: 43-8.
25. Garcia M, Platet N, Liaudet E, Laurent V, Derocq D, Brouilet JP. et al. Biological and clinical significans of cathepsin D in breast cancer metastasis. Stem Cell J 1996 Nov;14: 642-50.
26. Fukuda ME, Iwadate Y, Machida T, Hiwasa T, Nimura Y, Nagai Y,et al. Cathepsin D is a potential serum marker for prognosis in glioma patient. Cancer Res 2005; 65:5190-4.
27. Berchem G, Glondu M, Gleizes Mm Brouilet JP, Vignon F, Garcia M. Cathepsin D affect multiple tumor progression steps in vivo : proliferation, angiogenesis and apoptosis. Oncogen J 2002 August; 21: 5951-5.
28. Protein degradation, Neuromuscular disease, Washington Univ. 2007 (cited 2007 jun). Available from : URL:HYPERLINK : <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/degrade.htm&h>.
29. Metaye T, Kraimps JL, Goujon JM, Fernandez B, Quellard N, Ingrand P. Expresion, localization, and thyrotropin regulation of cathepsin D in human thyroid tissue. J Clin. Endocrinol & Metab 1997 Mar; 82: 3383-8.

30. Metaye T, Millet C, Kraimps JL, Aubouin B, Barbier J, Begon F. Estrogen receptors and cathepsin D in human thyroid tissue. *Cancer* 1993 Sept; 72 :1991-6.
31. Klonisch SH, Bialek J, Trojanovicz B, Weber E, Holzhausen HJ, Silvertown JD. Relaxin enhance the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *Am. J Pathol.* 2006; 169: 617-32
32. Pandey R, Patil N, Rao M, Proteases and protease inhibitor : Implication in antitumorigenesis and drug development, *Int J Hum Genet* 2007;7: 67-82.
33. Knigh G, Barret AJ, Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. *Biochem. J* 1976;155: 117-25.
34. Macinezyn J, Hartsuck JA, Tang J. Mode of inhibition of acid protease by pepstatin. *J Biological Chem* 1976; 251: 7088-93.
35. Baldwin ET, Bhat TN, Gulnik S, Hosur M, Sowder RC, Cachau RE. Crystal structure and inhibited form of human cathepsin D : Implication for lysosomal targeting and drug design. *J Biochem* 1993 Jul; 90: 6796-800.
36. IHC-Paraffin protocol (IHC-P). Abcam (cited 2007 jul). Available from : URL:HYPERLINK : http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/ihc_p.pdf
37. Methods and techniques for histologist and immunohistochemists. IHC World (cited 2007 jun). Available from : URL:HYPERLINK : <http://www.ihcworld.com/intro/antigen-retrieval.htm>.
38. How tissue are processed, Oral pathology associates Inc. (cited 2007 jul) available from URL:HYPERLINK : <http://www.oralpathologyassociates.com/doctors/processing-Frameset.html>.
39. Hahn M. Histology and immunohistochemistry, Institute of bioscience and bioengineering. (last update 2005 apr), Available from URL:HYPERLINK : http://www.bioc.rice.edu/bios_576/immuno/immuno.htm

40. Boenisch T. Staining methods : Handbook immunochemical staining methods-
Dacocytomation, California 2001. (cited 2007 jun).
Available from URL:HYPERLINK : <http://www.fip.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemical%20satining>
41. Immunohistochemistry (IHC), GenWay Biotech, Inc. (cited 2007 jul).
Available from URL:HYPERLINK : <http://www.fip.neurop.ruhr-uni-bochum.de/pub/melek/immunohistochemical%20satining>
42. Vectastain ABC method. (cited 2007 jun). Available from: URL:HYPERLINK :
<http://www.reactolab.ch/Vector/ABC%20Method.htm>
43. Monoclonal mouse anti-human cathepsin D clone DB2000. Dako Cytomation.
Denmark. M7155/EFG/SUA/25.03.03: 1-4.
44. Dinneen SF, Valimaki J. Distant metastases in papillary thyroid carcinoma : 100 cases
observed at one institution during 5 decades. J Clin Endocrinol and Metab 1995 (cited
2007 Nov 23). Available from : URL:HYPERLINK :
<http://sciencelinks.jp/j-east/article/200419/000020041904A0640902.php>
45. Hoie J. Distant metastases in papillary thyroid cancer: A review of 91 patient. Cancer
1988; 61:1-6. (cited 2007 oct 3) Available from : URL:HYPERLINK :
<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112684379/PDFSTART>
46. Santacroce L. Thyroid, papillary carcinoma. E-medicine last update 2005 jul 22.
Available from : URL:HYPERLINK : <http://www.emedicine.com/med/topic2464.htm>
47. Khan A. Variants of papillary carcinoma of the thyroid : experience at Asir Central
Hospital. J.R.Coll. Surg. Edinb. (last update 1998 feb). Available from :
URL:HYPERLINK: http://www.rese.d.ac.uk/journal/vol43_1_4310008.htm.

48. Saggiorato E. Characterization of thyroid 'follicular neoplasms' in fine-needle aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers : a proposal for clinical application. *J Endocrine-Related Cancer* 2005. (cited 2008 jan) Available from URL:HYPERLINK : <http://erc.endocrinology-journals.org/cgi/content/Full/12/2/305>.

Lampiran 1

TEKNIK PENGECATAN *HEMATOKSILIN EOSIN CARA MEYER*

1. Sediaan dicelup dalam larutan *xilol* bak I selama 5 menit.
2. Pindahkan dalam larutan *xilol* bak II selama 5 menit dan ke dalam larutan *xilol* bak III, selama 5 menit.
3. Masukkan dalam alkohol 96% bak I dan II masing-masing 2 menit, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 menit.
4. Cuci dalam air mengalir selama ± 10 menit.
5. Masukkan dalam larutan *meyer* hematoksin selama 15 menit.
6. Cuci kembali dengan air mengalir selama 20 menit.
7. Dimasukkan bak *eosin* 1 % selama 1 menit.
8. Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 2 menit kemudian alkohol 96% bak II dan III masing-masing 2 menit.
9. Terakhir dimasukkan dalam *xilol* bak I, II, dan III masing-masing 5 menit.
10. Ditutup dengan *entelan* dan *cover glass*.

(Prosedur tetap pembuatan histopatologi instalasi patologi anatomi FK Unair, Surabaya, 1997)

Lampiran 2**TEKNIK PULASAN IMUNOHISTOKIMIA DENGAN ANTIBODI *MOUSE******MONOCLONAL CATHEPSIN D* DARI SEDIAAN PARAFIN BLOK**

1. Blok parafin dipotong setebal 4 mikron dan di tempelkan pada *polylysine coated-slides*.
2. Dilakukan deparafinisasi, dengan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit.
3. Dilakukan rehidrasi dengan : alkohol absolut 100% selama 5 menit, alkohol 96% selama 5 menit, alkohol 70% selama 5 menit. – cuci dengan TRIS 2 kali selama 3 menit
4. Dilakukan tahap *microwave* selama 10 menit dengan 10 mM sitrat *buffer* pH 6.
5. Dicuci dengan TRIS 2 kali selama 3 menit
6. Dilakukan *blocking* dengan *dual endogenous enzyme block (kit)* pada suhu ruang
7. Dicuci dengan TRIS 2 kali selama 3 menit
8. Inkubasi dengan antibodi primer pada suhu 2-8⁰ C selama satu malam.
9. Dicuci dengan TRIS 2 kali selama 3 menit
10. Inkubasi dengan *biotinylated secondary antibody* pada suhu ruang selama 30 menit.
11. Dicuci dengan TRIS 2 kali selama 3 menit
12. Ditetesi larutan peroksidase DAB (*chromogen DAB*) pada suhu ruang selama 5 – 10 menit
13. Cuci dengan *aquadest* 2 kali selama 3 menit
14. *Counter stain* dengan *meyer hematoxylin* selama 5 menit
15. Dehidrasi dengan alkohol 80% selama 5 menit, alkohol 95% selama 5 menit, alkohol absolut selama 5 menit
16. *Clearing* 3 kali dengan *xylol*.
17. *Mounting* dengan *entelan*.

Data penelitian : Ekspresi Cathepsin D pada karsinoma tiroid tipe papiler

No	Name	Gender	Umur	Reg	IR-PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA						STD	Intensitas ekspresi cath D	% sel tercat positif	Skor	
					Tgl Op	No PA	Φ (cm)	T	N	M					
1	Solichah	P	67	10227961	30-3-2005	T. 1349/05	2x1,8	2	+	+	(paru)	IV	Strong (3)	80 (4)	12
2	Kamilah	P	45	10435601	25-4-2005	T. 1749/05	3,5x2,3	2	+	+	(frontal)	IV	Strong (3)	80 (4)	12
3	Yanah	P	53	10477041	15-9-2005	T. 4257/05	2.5x0,8	2	+	+	(frontal)	IV	Strong (3)	80 (4)	12
4	Anifah	p	46	10643219	28-9-2006	T. 5056/06	0,5x3	2	+	+	(axilla)	IV	Medium(2)	60 (3)	6
5	Chusnul chotimah	P	42	10507054	25-6-2007	T. 3618/07	1,5x3	2	+	+	(paru,Hepar)	IV	Strong (3)	80 (4)	12
6	Saima	p	43	10631348	19-1-2007	T. 375/07	2x1,5	3	+	+	(frontal)	IV	Strong (3)	75 (4)	12
7	M. Thoyib	L	69	10703535	3-7-2007	T. 3792/07	3x1	2	+	+	(paru)	IV	Strong (3)	80 (4)	12
8	Marulem	p	67	10740924	1-10-2007	T. 5686/07	1,5x1,5	2	+	+	(Vth 1-2, costa)	IV	Strong (3)	70 (3)	12
9	Satiman	L	67	10739189	30-8-2007	T. 5028/07	3x1,5	2	+	+	(paru)	IV	Strong (3)	60 (3)	9
10	Sutarji	L	48	10634214	6-9-2006	T. 4629/06	3x3	2	+	+	(sternum)	IV	Strong (3)	70 (3)	9
11	Katemi	p	63	10556520	14-2-2006	T.806/06	3x1,5	2	-	-		II	Medium(2)	40 (2)	4
12	Atun	p	49	10633812	9-11-2006	T.5752/06	2x1	2	-	-		II	Strong (3)	40 (2)	6
13	Mukhayaroh	p	46	10472331	10-5-2005	T. 2018/05	2,5x2	2	-	-		II	Strong (3)	50 (3)	9
14	Karomah	p	36	10572054	28-4-2006	T. 2224/ 06	1,2x2,5	2	-	-		II	Strong (3)	40 (2)	6
15	Sri Hartatik	p	50	10693758	26-2-2007	T.1131/07	3x2,5	2	-	-		II	Strong (3)	25 (2)	6
16	Kip Sugiarti	p	21	10618176	10-10-06	T.5262/06	3x0,5	2	-	-		II	Strong (3)	80 (4)	12
17	Sainten	p	50	10648930	13-10-06	T.5343/06	4x4	3	-	-		II	Strong (3)	30 (2)	6
18	Supar	p	64	10641449	17-10-06	T.5397/06	2,5x2	2	-	-		II	Strong (3)	10 (1)	3
19	Munawaroh	P	34	10587341	26-6-06	T.3287/06	2,5x2	2	-	-		II	Strong (3)	50 (3)	9
20	Supiah	P	41	10586995	4-5-06	T.2349/06	0,5x2	2	-	-		II	Strong (3)	50 (3)	9

Lampiran 4

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Metastasis	20	1,50	,513	1	2
Skor	20	8,90	3,059	3	12

Chi-Square Test

Frequencies

Metastasis

	Observed N	Expected N	Residual
Metastatis	10	10,0	,0
tidak metastasis	10	10,0	,0
Total	20		

Skor

	Observed N	Expected N	Residual
3	1	4,0	-3,0
4	1	4,0	-3,0
6	5	4,0	1,0
9	5	4,0	1,0
12	8	4,0	4,0
Total	20		

Test Statistics

	Metastasis	Skor
Chi-Square(a,b)	,000	9,000
Df	1	4
Asymp. Sig.	1,000	,031

a 0 cells (,0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 10,0.

b 5 cells (100,0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 4,0.

Quantities derived from a 2-by-2 table

Quantities Derived from the 2-by-2 Contingency Table	Value	95% Conf. Interval	
Odds Ratio (OR) = $(a/b)/(c/d)$;	36.000	3.242	356.844
Relative Risk (RR) = $(a/r1)/(c/r2)$;	4.889	1.769	8.953
Kappa	0.700	0.283	0.860
Overall Fraction Correct = $(a+d)/t$; (often referred to simply as "Accuracy")	0.850	0.641	0.930
Mis-classification Rate, = $1 - \text{Overall Fraction Correct}$;	0.150	0.070	0.359
Sensitivity = $a/c1$; (use <u>exact Binomial confidence intervals</u> instead of these)	0.800	0.591	0.880
Specificity = $d/c2$; (use <u>exact Binomial confidence intervals</u> instead of these)	0.900	0.691	0.980
Positive Predictive Value (PPV) = $a/r1$; (use <u>exact Binomial confidence intervals</u> instead of these)	0.889	0.657	0.978
Negative Predictive Value (NPV) = $d/r2$; (use <u>exact Binomial confidence intervals</u> instead of these)	0.818	0.629	0.891
Difference in Proportions = $a/r1 - c/r2$;	0.707	0.286	0.868
# Needed to Treat = $1 / \text{Difference in Proportions}$;	1.414	1.151	3.502
Absolute Risk Reduction (ARR) = $c/r2 - a/r1$; <more info>	-0.707	-0.868	-0.286
Relative Risk Reduction (RRR) = $\text{ARR}/(c/r2)$; <more info>	-3.889	-7.953	-0.769
Positive Likelihood Ratio (+LR) = $\text{Sensitivity} / (1 - \text{Specificity})$;	8.000	1.916	43.742
Negative Likelihood Ratio (-LR) = $(1 - \text{Sensitivity}) / \text{Specificity}$;	0.222	0.123	0.591
Diagnostic Odds Ratio = $(\text{Sensitivity}/(1-\text{Sensitivity})) / ((1-\text{Specificity})/\text{Specificity})$;	36.000	3.242	356.844
Error Odds Ratio = $(\text{Sensitivity}/(1-\text{Sensitivity})) / (\text{Specificity}/(1-\text{Specificity}))$;	0.444	0.646	0.150
Youden's J = $\text{Sensitivity} + \text{Specificity} - 1$;	0.700	0.283	0.860
Number Needed to Diagnose (NND) = $1 / (\text{Sensitivity} - (1 - \text{Specificity})) = 1 / (\text{Youden's J})$; <more info>	1.429	1.163	3.537
Forbes' NMI Index; <more info>	0.397	0.059	0.657
Contingency Coefficient;	0.575	0.273	0.654

Adjusted Contingency Coefficient;	0.814	0.387	0.925
Phi Coefficient (= Cramer's Phi, and = Cohen's w Index, for 2x2 table);	0.704	0.284	0.864
Yule's Q = $(a*d-b*c)/(a*d+b*c) = (OR - 1) / (OR + 1)$; <more info>	0.946	0.528	0.994
Equitable Threat Score = $(a-e)/(a+b+c-e)$, where $e = r1*c1/t$; <more info>	0.538	0.165	0.754