

KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

KORELASI EKSPRESI VEGF-C DENGAN GRADING HISTOPATOLOGI
KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA DAN LEHER



PPDS. IB. 02/10.

Mat

k



Oleh:

Fendy Matulatan, dr.

Pembimbing:

Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr.SpB(K)Onk.

Tulus Panuwun, dr.MS, SpPA(K)

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


**KORELASI EKSPRESI VEGF-C DENGAN GRADING HISTOPATOLOGI
KARSINOMA SEL SKUAMOSA KEPALA DAN LEHER**


KARYA TULIS ILMIAH AKHIR PPDS-1 ILMU BEDAH

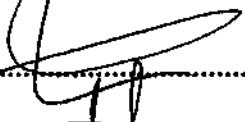
Telah disetujui oleh
Panitia Penguji pada tanggal 20-2-2009
Sebagai persyaratan dalam Program Pendidikan Ilmu Bedah
FK Unair / RSU. Dr. Soetomo Surabaya


Tim penguji karya akhir

1. Prof.Sunarto Reksoprawiro, dr.Sp.B(K)Onk.
(Pembimbing I)
2. Dr. Tulus Panuwun,MS SpPA(K)
(Pembimbing II)
3. DR. Eddy Herman Tanggo,dr. SpB(K)Onk
(Biro Penelitian)
4. Dr.Yoga Wijayahadi, SpB(K)KL
(Divisi Bedah Kepala dan Leher)

1. 
.....

2. 
.....

3. 
.....

4. 
.....

Mengetahui
KPS Ilmu Bedah



(Dr.Yoga Wijayahadi, SpB(K)KL)

**Korelasi Ekspresi VEGF-C dengan Grading Histopatologi
Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher
Fendy Matulatan*, Sunarto Reksoprawiro*, Tulus Panuwun****

* Bagian Ilmu Bedah, FK Unair – RSUD Soetomo, Surabaya

** Bagian Patologi Anatomi, FK Unair – RSUD Soetomo, Surabaya

Latar Belakang:

Karsinoma sel skuamosa kepala leher masih menjadi masalah yang kompleks dalam penanganannya. Sistem grading secara mikroskopik saja tampaknya tidak banyak membantu dalam penanganan kasus keganasan tersebut. Kerusakan sel epitel akibat proses onkogenesis dapat menginduksi peningkatan sitokain seperti VEGF-C yang telah terbukti pada kasus keganasan rektal, prostat dan payudara. Upaya mencari faktor prediktor dari jaringan tumor yang berkorelasi dengan tingkat keganasan selain sistem grading dari Broder, diharapkan dapat membantu dalam penanganan untuk mengurangi morbiditas, mortalitas dan meningkatkan angka harapan hidup.

Tujuan

Mengetahui apakah peningkatan ekspresi VEGF-C mempunyai korelasi dengan grading histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Bahan dan Metodologi:

Rancangan penelitian yang digunakan adalah retrospektif analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Sampel penelitian adalah blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala dan leher yang tersimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Soetomo selama tahun 2006-2008. Subyek penelitian tercatat dalam dokumen medis di rekam medis RSUD Soetomo Surabaya. Tiga puluh dua blok parafin dicat dengan hematoksin eosin dan diperiksa imunohistokimia dengan menggunakan poliklonal antibodi VEGF-C untuk melihat grading dan ekspresi VEGF-C. Grading histopatologis dinyatakan sebagai *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated* dan *undifferentiated*. Derajat ekspresi VEGF-C berdasarkan gradasi intensitas sel yang tercatat dinyatakan secara semikuantitatif antara 0 sampai +3. Korelasi antara grading histopatologis dan ekspresi VEGF-C dianalisis dengan uji korelasi *Spearman Rank-Order Correlation Test*.

Hasil :

Dari 32 sampel karsinoma sel skuamosa kepala dan leher seluruhnya didapatkan ekspresi VEGF-C pada seluruh sampel dengan ekspresi dan intensitas imunostaining yang berbeda-beda. Distribusi grading histopatologis ialah *well differentiated* sebanyak 9 (28,1%), *moderately differentiated* sebanyak 8(25%), *poorly differentiated* sebanyak 8(25%), dan *undifferentiated* sebanyak 7(21,9%) sampel. Ekspresi VEGF-C +1, +2, dan +3 didapatkan berturut-turut pada 9 (28,1%), 21 (65,7%), dan 2 (6,2%) sampel.

Hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan ekspresi VEGF-C mempunyai korelasi yang signifikan dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,619. Semakin kuat intensitas ekspresi VEGF-C maka semakin jelek derajat diferensiasi sel.

Kesimpulan:

Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi VEGF-C dengan grading histopatologi.

Kata kunci: Karsinoma sel skuamosa, Kepala dan Leher, VEGF-C

Correlation of VEGF-C Expression and Histopathological Grading of Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck

Fendy Matulatan*, Sunarto Reksoprawiro*, Tulus Panuwun**

* Department of Surgery, Airlangga University Medical School-dr.Sutomo General Hospital , Surabaya

** Department of Pathology, Airlangga University Medical School-dr.Sutomo General Hospital, Surabaya

Background

Squamous cell carcinoma of head and neck still posed complex problem in management. Microscopic grading system only is not adequate in managing these cases. Epithelial damage due to oncogenesis can induce the increase of cytokines such as VEGF-C , which have been proved in rectal, prostate, and breast malignancy. The effort in finding other predictive factors other than Broder staging is expected to improve the management of these patients and reduce morbidity , mortality and increase life expectancy.

Objectives

To find out whether the increase of VEGF-C is correlated with the histopathological grading of head and neck squamous cell carcinoma.

Material and methods

This study used a retrospective analytic design with cross sectional approach. The samples were paraffin block of head and neck squamous cell carcinoma that were kept in the Pathology Department Laboratory of dr.Sutomo General Hospital between 2006-2008. Clinical records were obtained from medical records of respective samples. Thirty two paraffin blocks were stained with hematoxylin eosin and polyclonal antibody of VEGF-C to examine the grading and VEGF-C expression. Histopathological staging was categorized as well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated and undifferentiated. VEGF-C expression was graded semiquantitatively between 0 and +3. Correlation between histopathological grading and VEGF-C expression was analyzed using Spearman Rank-Order correlation test.

Results

From 32 samples , we found different VEGF-C expression. The distribution of histopathological grading was : well differentiated in 9(28,1%), moderately differentiated in 8 (25%), poorly differentiated in 8 (25%) and undifferentiated in 7 (21,9%). VEGF-C expression distribution was +1 in 9 samples (28,1%), +2 in 21 samples (65,7%)and +3 in 2 samples (6,2%).

Spearman Rank-Order correlation test showed that VEGF-C have an significant correlation with histopathological grading in head and neck squamous cell carcinoma with the correlation coefficient of 0,619. The stronger VEGF-C expression was showed by the poorer the cell differentiation.

Conclusion

There is a significant correlation between VEGF-C expression and histopathological grading

Keywords : head and neck, squamous cell carcinoma, VEGF-C

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Tuhan YME yang senantiasa melimpahkan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah akhir Korelasi Ekspresi VEGF-C dengan Grading Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan dokter spesialis bidang studi ilmu bedah di Laboratorium Ilmu Bedah FK UNAIR/RSU Dr Soetomo Surabaya.

Laporan karya ilmiah akhir ini secara garis besar berisi latar belakang masalah, rumusan masalah, tujuan penelitian dan manfaat penelitian. Dibahas juga secara singkat landasan teori yang berkaitan dengan ekspresi VEGF-C pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Pada laporan ini juga dipaparkan tentang kerangka konseptual yang merupakan ringkasan dari konsep yang berhubungan dengan variabel-variabel yang diteliti beserta metodologi penelitiannya.

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.
4. **Prof. Sunarto Reksoprawiro, dr, SpB(K)Onk** selaku Kepala Departemen Ilmu Bedah sekaligus sebagai pembimbing dalam karya tulis ilmiah akhir saya , yang atas ketekunan, ketelitian dan kesabaran beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya serta menanamkan disiplin yang tinggi selama saya menempuh pendidikan.
5. **Yoga Wijayahadi, dr. SpB(K)KL** selaku Ketua Program Studi Ilmu Bedah dan juga sebagai penguji karya tulis ilmiah akhir saya, yang atas ketekunan, kesabaran dan ketelitian beliau dalam memberikan arahan dalam penelitian saya.
6. **Tulus Panuwun, dr. MS, SpPA(K)** , selaku pembimbing dan penguji di bidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam membimbing saya serta memberi masukan dalam penelitian saya.
7. **Prof. Dr. Juliati Hood Alsagaff, dr MS, SpPA(K), FIAC**, selaku pembimbing dibidang patologi anatomi yang telah meluangkan waktunya dalam melakukan pemeriksaan dan pembacaan imunohistokimia serta memberikan masukan dalam penelitian saya ini.
8. **DR. Eddi Herman Tanggo, dr. SpB(K)Onk**, selaku penguji pada penelitian ini yang telah meluangkan waktunya untuk menguji dan memberikan masukan serta perbaikan dalam penelitian saya ini.
9. **Budiono, dr. Mkes**, yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing saya khususnya dalam bidang statistik dan metodologi penelitian.
10. **Ary Wahyudiono, AMd**, beserta karyawan di lingkungan laboratorium/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr. Soetomo telah banyak membantu selama menyelesaikan penelitian ini.
11. **Seluruh teman sejawat / rekan residen, paramedis dan karyawan di lingkungan Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga RSUD Dr.**

Soetomo Surabaya yang telah banyak membantu dan jalinan kerjasama yang baik selama masa pendidikan maupun selama menyelesaikan penelitian ini.

- 12. Semua pihak yang telah membantu dalam kelancaran penelitian ini serta ucapan terima kasih yang tulus saya sampaikan kepada seluruh pasien yang telah memberikan peranan besar dalam penelitian ini.**
- 13. Istri saya tercinta Angelina , kedua anaku tersayang Timothy Julian dan Margaret Odelia, terima kasih untuk seluruh cinta, kasih sayang, pengorbanan, kesabaran, pengertian dan dorongan yang terus menerus diberikan selama pendidikan**

Surabaya, Desember 2008

Penulis

DAFTAR ISI



KATA PENGANTAR i

DAFTAR ISI iv

DAFTAR GAMBAR DAN TABEL.....vii

DAFTAR LAMPIRAN ix

DAFTAR SINGKATAN..... x

BAB 1 PENDAHULUAN 1

 1.1 Latar Belakang 1

 1.2 Rumusan masalah 4

BAB 2 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN 5

 2.1 Tujuan penelitian 5

 2.1.1 Tujuan umum 5

 2.1.2 Tujuan khusus 5

 2.2 Manfaat penelitian 6

 2.2.1 Manfaat teoritis 6

 2.2.2 Manfaat klinis 6

BAB 3 TINJAUAN KEPUSTAKAAN 7

 3.1 Etiologi.....7

3.2	Staging.....	9
3.3	Grading Histopatologis.....	11
3.4	Kelenjar Getah Bening.....	11
3.5	VEGF.....	13
3.6.	Macam-macam VEGF.....	13
3.7	VEGF-C.....	15
3.8	Reseptor.....	16
3.9	Angiogenesis.....	18
3.10	Limfangiogenesis.....	19
BAB 4 KERANGKA KONSEPTUAL.....		22
BAB 5 METODE PENELITIAN.....		24
5.1	Jenis dan rancangan penelitian	24
5.2	Populasi	24
5.3	Sampling	24
5.4	Kriteria Bahan Penelitian	25
5.5	Variabel penelitian	25
5.6	Definisi Operasional	25

5.7	Kerangka Operasional	27
5.8	Lokasi dan Waktu Penelitian	27
5.9	Tahap Penelitian	28
BAB 6 HASIL PENELITIAN		
6.1	Karakteristik Sampel Penelitian	29
6.2	Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi VEGF-C pada Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher	31
6.3	Analisis hasil penelitian	35
BAB 7 PEMBAHASAN		
37		
7.1	Gambaran Umum Hasil Penelitian	37
7.2	Korelasi antara ekspresi VEGF-C dengan grading histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher	40
7.3	Aplikasi klinis VEGF-C	41
7.4	Hubungan VEGF-C dengan factor prognostik lain.....	41
7.5	Korelasi ekspresi VEGF-C pada tumor lainnya.....	42
7.6	Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan imunohisto- kimia VEGF-C.....	42
BAB 8 KESIMPULAN DAN SARAN		
48		
DAFTAR PUSTAKA		
49		
LAMPIRAN		
56		

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1** Overekspresi VEGF-C dan blokade anti VEGFR-3 Antibodi
- Gambar 2** *VEGF-C* menginduksi *VEGFR2* dan 3
- Gambar 3** Penonjolan pada pembuluh limfe untuk memulai proses limfangiogenesis.
- Gambar 4** Pembentukan pembuluh darah baru(angio genesis) atau pembuluh limfe yang baru (limfangiogenesis)
- Gambar 5** Karsinoma laring (TIF5.2008/T.455/2008) Well differentiated squamous cell carcinoma di mana 10% dari sel-sel positif dengan VEGF-C (merah pada sitoplasma). Pembesaran 400 kali dengan mikroskop Olympus BX50.
- Gambar 6** Karsinoma laring (TIF1/2008)/(T.455/2008) Moderately differentiated squamous cell carcinoma di mana 25% dari sel-sel positif dengan VEGF-C. Pembesaran 200 kali dengan mikroskop Olympus BX50.
- Gambar 7** Karsinoma nasal (TIF15/2008)/(T.6335/07). Poorly differentiated squamous cell carcinoma, menunjukkan 40% sel-sel positif pada pemeriksaan imunohistokimia dengan VEGF-C (sisi kiri) dan hasil negative pada sisi kanan. Pembesaran 400x dengan mikroskop Olympus BX50.
- Gambar 8** Karsinoma Nasofaring (TIF25/2008)(T.3604/08) Undifferentiated squamous cell carcinoma dengan lebih dari 50% menunjukkan reaksi positif dengan VEGF-C pada pemeriksaan imunohistokimia (merah pada sitoplasma).Dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 400 kali
- Gambar 9** Hubungan antara median skor ekspresi VEGF-C dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Klasifikasi sistim TNM menurut <i>UICC/AJCC</i>	9
Tabel 2	Grading histopatologis karsinoma sel skuamosa menurut sistem Broder	26
Tabel 3	Karakteristik sampel penelitian	29
Tabel 4	Distribusi jenis kelamin dan umur pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	29
Tabel 5	Distribusi umur, kelamin, grading histopatologis serta ekspresi <i>VEGF-C</i> penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	30
Tabel 6	Diagnosis klinis dan grading histopatologis penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	31
Tabel 7	Ekspresi <i>VEGF-C</i>	32
Tabel 8	Uji Korelasi Spearman eskpresi <i>VEG-C</i> dengan gradlng histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	35
Tabel 8	Tabulasi silang ekspresi <i>VEGF-C</i> dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara pemeriksaan histopatologis dengan pengecatan Hematoksilin Eosin cara Meyer untuk menentukan grading karsinoma sel skuamosa	56
Lampiran 2	Cara pemeriksaan imunohistokimia untuk medeteksi VEGF-C	58
Lampiran 3	Hasil pemeriksaan imunohistokimia VEGF-C dari Laboratorium PA-FK Unair- RSU Dr.Soetomo Surabaya	60
Lampiran 4	Sampel Penelitian Korelasi Ekspresi VEGF-C Dengan Grading Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala Dan Leher	61
Lampiran 5	Analisis Hasil Statistik	63
Lampiran 6	Datasheet N1619, Antibodi polyclonal Human VEGF-C dari Biovision	68

Daftar Singkatan

COX-2	cyclooxygenase -2
EGFR	epidermal growth factor reseptor
FGF	fibroblast growth factor
Flk-1	fetal liver kinase 1 (mouse VEGFR-1)
Flt-1	fms-like tyrosine kinase-1 (VEGFR-1)
HPV	human papilomavirus
KDR	kinase insert domain containing reseptor (human VEGFR-2)
NSND	non smoker non drinking
PDGF	platelet derived endothelial growth factor
PIGF	placenta growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor reseptor
VPF	vascular permeability factor

BAB 1

PENDAHULUAN



1. Latar Belakang

Keganasan kepala leher merupakan keganasan epitelial agresif dalam enam keganasan tersering sedunia. Terhitung hampir 5000 kasus baru di negara Amerika Serikat dengan estimasi mendekati 56.520 kasus selama tahun 2004 dan 600.000 kasus di seluruh dunia berdasar angka terakhir dari *International Agency for Research on Cancer* dari badan WHO. Kematian akibat keganasan kepala leher mencapai 2% dari seluruh kematian akibat penyakit keganasan di Amerika Serikat. Karsinoma sel skuamosa merupakan keganasan tersering dari traktus aerodigestivus atas tersebut. Walau penanganannya sudah lebih maju, namun kompleksnya masalah karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan tingginya angka morbiditas, angka hidup masih di bawah 45%, dan hanya sedikit membaik dalam dekade terakhir^(1,2).

Hasil yang jelek pada penanganan keganasan kepala leher disebabkan oleh multi faktorial, termasuk keterlambatan deteksi dan adanya tumor primer multipel. Berdasarkan konsep yang banyak diterima yaitu kerusakan seluler yang menjadi sebab transformasi neoplasma, maka muncul suatu paradigma pemberian kemoprevensi untuk mencegah timbulnya tumor primer kedua^(1,3).

Perubahan gen supresor tumor seperti p53 yang berlokasi pada 17p13, sering ditemukan pada keganasan kepala leher dan terjadi kurang lebih 50% dari tumor. Imunohistokimia positif juga terdeteksi pada 45% lesi displasia, 29 % lesi hiperplastik, 21% pada jaringan normal⁽⁴⁾.

Overekspresi *Cyclin D1* protoonkogen pada kromosom 11q13 encode protein *Cyclin D1*, yang mengakibatkan progresi siklus sel lewat G1, didapatkan hanya sekitar 30-50% keganasan kepala leher⁽⁵⁾. Oleh Benjamin dkk, didapatkan ekspresi *Cyclin D1* dan p53 tidak berhubungan secara signifikan dengan prognosis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher⁽⁶⁾. *Epidermal growth factor reseptor (EGFR)* juga sering ditemukan dan bahkan pada proses keganasan dini, dimana *EGFR* merupakan pengikat banyak faktor pertumbuhan yang menstimulasi proliferasi sel normal maupun neoplasma. Overekspresi *EGFR* mencapai 85% pada keganasan kepala leher^(7,8).

Hipermetilasi DNA p16 merupakan prediktor pada kasus metastase jauh namun hanya didapatkan positif pada 50% kasus karsinoma sel skuamosa kepala dan leher⁽⁹⁾.

Kesemuanya tersebut merupakan multi faktor yang sangat mempengaruhi hasil penanganan keganasan kepala dan leher walaupun diterapi dengan multi modalitas seperti radioterapi, kemoterapi dan tindakan bedah. Namun dengan pendekatan multidisiplin, keberhasilan terapi dapat mencapai 70% pada penderita dengan *local advance*, non metastase. Di sisi lain, angka rekurensi mencapai sekitar 50% pada penderita resiko tinggi, yang sering dengan metastase jauh, dan sulit diobati sehingga tujuan terapi berubah menjadi paliatif⁽¹⁰⁻¹³⁾.

Dari penelitian lain ditemukan bahwa kelenjar limfe sangat berperan dalam metastase keganasan kepala leher dimana terlihat bentukan jaringan limfe yang baru intra dan peritumoral. Faktor yang mempengaruhi limfangiogenesis diketahui awal abad 20 ini dipromosi oleh *VEGF-C* dan *-D*, dan terakhir disinyalir *VEGF-A* dapat juga merangsang proses tersebut selain angiogenesis⁽¹⁴⁻¹⁸⁾.

Pada dekade sebelumnya, hanya *VEGF-A* yang dapat dideteksi pada hampir semua keganasan dan dilaporkan mempunyai hubungan dengan prognosa melalui proses angiogenesis^(14,19,20). Belakangan ini, overekspresi *VEGF-C* sudah ditemukan pada sebagian besar keganasan. Level ekspresi *VEGF-C* pada tumor primer menunjukkan korelasi antara metastase dengan gambaran histopatologis pada keganasan tiroid, payudara, rahim, prostat, kandung kemih, lambung, kolorektal, paru dan esofagus^(17,21,22). Pada keganasan sel skuamosa kepala leher juga didapatkan korelasi antara *VEGF-A* dan *C* dengan metastasis limfatik, ekspresi tersebut bukan akibat efek sekunder pada angiogenesis vaskuler melainkan efek pada sel endotel limfatik⁽¹⁵⁾. Benjamin dkk (2000), meneliti hubungan prognostik dengan level protein *VEGF* yang diperiksa secara imunohistokimia, mendapatkan kepositifan *VEGF* merupakan prediktor yang signifikan pada keganasan sel skuamosa kepala dan leher⁽⁵⁾. Namun oleh Panayiotis AK dkk(2005), juga dengan pemeriksaan imunohistokimia, mendapatkan overekspresi *VEGF* tidak signifikan dengan metastasis kelenjar getah bening, namun kepositifan *VEGF* tampaknya ada berhubungan dengan rendahnya angka harapan hidup⁽²³⁾. Hasil penelitian tersebut mungkin akan berbeda bila dilakukan pemeriksaan dengan *VEGF-C* yang bekerja dalam proses limfangiogenesis yang berkorelasi dengan penyebaran tumor⁽¹⁵⁾.

Makin tinggi *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala leher, makin besar kemungkinan terjadinya metastasis. Pada penelitian Ahmed Mu dkk (2007) didapatkan *occult metastasis* sebesar 22,2% pada kasus diferensiasi baik, 25% pada kasus diferensiasi sedang dan 54,6% pada kasus diferensiasi buruk⁽²⁴⁾.

Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini akan dicari bagaimana hubungan overekspresi *VEGF-C* dengan *grading* histopatologis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, sehingga dengan pemeriksaan ekspresi *VEGF-C* dapat digunakan sebagai prediktor molekuler *outcome* klinis penderita dengan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dengan *grading* histopatologi pada keganasan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

2.1.1 Tujuan Umum

Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepaladan leher.

2.1.2 Tujuan Khusus

2.1.2.1. Mengetahui korelasi antara ekspresi *VEGF-C* dengan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.1.2.2. Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dan *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.1.2.2.1 Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dan *grading* histopatologi *well differentiated* karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.1.2.2.2 Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dan *grading* histopatologi *moderate differentiated* karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.1.2.2.3 Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dan *grading* histopatologi *poorly differentiated* karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.1.2.2.4 Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dan *grading* histopatologi *undifferentiated* karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.2. Manfaat Penelitian

2.2.1. Manfaat teoritis

Mengetahui korelasi antara derajat ekspresi *VEGF-C* dengan sifat pertumbuhan karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

2.2.2. Manfaat klinis

2.2.2.1 Dengan mengukur ekspresi *VEGF-C* , dapat digunakan sebagai parameter nilai prognostik penderita

2.2.2.2 Dengan mengetahui adanya ekspresi *VEGF-C* pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, maka dapat dipertimbangkan obat penghambat angiogenesis dan limfangiogenesis sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan tersebut

2.2.2.3 Dapat melakukan penelitian lanjut tentang efek obat penghambat angiogenesis dan limfangiogenesis terhadap penghambatan pertumbuhan dan penyebaran tumor

BAB 3

TINJAUAN KEPUSTAKAAN

Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher

Masih tetap menjadi tantangan tersulit dalam penanganan keganasan kepala leher sampai saat ini. Angka harapan hidup selama lima tahun masih sekitar 50% dalam lima tahun terakhir. Efek tindakan pembedahan sering menimbulkan masalah yang signifikan pada proses menelan, bicara dan tampilan fisik. Penambahan kemoterapi pada radiasi memperlihatkan ada sedikit kemajuan terapi, namun tetap tidak meningkatkan angka harapan hidup. Resistensi karsinoma sel skuamosa terhadap kemoterapi membuat kemoterapi menjadi tidak berguna. Banyak penelitian dilakukan untuk mencari terapi baru yang lebih baik berdasarkan pengetahuan mengenai biomolekuler keganasan tersebut^(10,11).

Etiologi

Sebagian besar penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher mempunyai riwayat berkaitan dengan penggunaan tembakau dan alkohol. Baik pada pecandu rokok dan sekaligus alkohol, maupun masing-masing hanya perokok tanpa penggunaan alkohol atau sebaliknya. Penggunaan obat-obat kumur yang berbasis alkohol juga dituding sebagai salah satu penyebab. Timbulnya kasus karsinoma sel skuamosa kepala leher pada penderita bukan pecandu rokok dan peminum alkohol (*NSND: non-smoker and non drinker*) terutama disebabkan human papilomavirus (*HPV*), *Epstein-Barr* terutama di negara Asia dan negara Afrika Utara. Faktor lainnya berupa rendahnya konsumsi buah dan sayur, defisiensi zat besi, higiene orai, refluks gastro-esofageal, imuno defisiensi, faktor genetik. Faktor lingkungan dan pekerjaan juga berpengaruh seperti pekerja tambang nikel, tukang kayu, pekerja pabrik tekstil^(2,13,25,26).

Infeksi *Human Papillomavirus (HPV)* memegang peranan penting dalam patogenesis keganasan kepala leher. Merupakan virus *DNA* yang bekerja spesifik pada epitel skuamosa, mempunyai 120 macam tipe yang berbeda yang telah berhasil diisolasi. *Low-risk HPV* seperti *HPV-6* dan *-11*, menginduksi hiperproliferasi epitel menjadi papiloma atau kutil. Prototipe *high-risk* seperti *HPV-16* dan *-18* berkemampuan merubah sel epitel melalui onkoprotein viral *E6* dan *-E7*, yang berfungsi menginaktivasi protein *tumor-suppresor p53* dan *pRb*. Ekspresi *HPV-E6* dan *-E7* menghasilkan proliferasi seluler, hilangnya regulasi siklus sel, gangguan differensiasi seluler dan peningkatan frekuensi mutasi spontan, mutasi mutagen dan instabilitas kromosom⁽²⁷⁾.

Kasus keganasan sel skuamosa kepala leher tanpa infeksi *HPV*, terutama akibat mutasi *p53* oleh karsinogen dari rokok, atau gangguan siklus *pRb* oleh mekanisme inaktivasi *p16* atau amplifikasi *cyclin D*⁽²⁷⁾.

Gambaran klinis

Gambaran pre-maligna biasanya hanya berupa lesi kemerahan dengan sedikit peninggian yang disebut eritroplasia, pada awalnya lesi kemerahan ini asimtomatik dan dapat merupakan suatu karsinoma in situ atau karsinoma invasif. Sepertiga dari lesi pre-maligna berupa lesi keputihan, yang dikenal sebagai leukoplakia, namun hanya 10% saja yang berubah menjadi karsinoma in situ atau karsinoma invasif⁽²⁸⁾.

Daerah yang paling sering terkena adalah dasar mulut, lidah, palatum mole, arkus faringus anterior dan trigonum retromolar. Keluhan nyeri pada lesi menandakan terjadinya invasi perineural. Gejala lanjut berupa sakit tenggorokan yang menetap atau infeksi telinga bila lesi menjadi massa yang teraba^(2,28).

Staging

Sistim *staging* dibuat untuk klasifikasi, strategi terapi, evaluasi efektivitas terapi, serta penentuan prognosis. Sistim klasifikasi *TNM* yang dikeluarkan oleh *the Union Internationale for the Control of Cancer (UICC)* dan *American Joint Commission of Cancer (AJCC)* memberikan persamaan persepsi dalam penentuan klasifikasi tumor dan akhirnya kesamaan penilaian hasil terapi dan prognosis. Pada keganasan rongga mulut, orofaring, dan kelenjar liur mayor, T berdasarkan ukuran tumor, sementara pada laring, hipofaring dan nasofaring, T-nya berdasarkan keterlibatan ekstensi lokalnya^(2,29).

Penentuan sistim *TNM* dari *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)/AJCC* untuk menentukan stadium pada keganasan kepala leher, yaitu⁽³⁰⁻³²⁾:

Tabel 1. Klasifikasi sistim *TNM* menurut *UICC/AJCC*

	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Stadium IV A	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Tiap T	N2	M0
Stadium IV B	Tiap T	N3	M0
Stadium IV C	Tiap T	Tiap N	M 1

Ukuran tumor primer (T) diberi indeks angka 0,1,2,3,4

T0 = tidak ditemukan tumor primer

Tis = karsinoma in situ.

T1 = tumor dengan diameter ≤ 2 cm

T2 = tumor dengan diameter >2 cm, <4 cm.

T3 = tumor dengan diameter > 4 cm.

T4 = tumor invasi struktur sekitar (tembus korteks tulang, kulit, otot profunda)

Untuk menggambarkan ada tidaknya keterlibatan kelenjar getah bening regional (N), dibuat klasifikasi sebagai berikut :

Nx = kelenjar getah bening regional tak dapat ditentukan.

N0 = tidak didapatkan pembesaran kelenjar getah bening.

N1 = metastase pada KGB regional, satu nodus, ipsilateral, diameter ≤ 3 cm.

N2a = metastase KGB regional, satu nodus, ipsilateral, diameter 3- 6 cm.

N2b = metastase KGB regional, multiple nodus, ipsilateral, diameter < 6 cm.

N2c = metastase KGB regional, bilateral atau kontralateral, diameter < 6 cm.

N3 = metastase KGB, diameter > 6 cm.

Untuk menggambarkan ada atau tidaknya metastase jauh (M) :

Mx = adanya metastase jauh tak dapat ditentukan

M0 = tidak didapatkan metastase jauh.

M1 = ada metastase jauh.

Grading histopatologi

Secara mikroskopik dibagi atas 2 jenis yaitu kornifikasi (*keratinizing*) dan non-kornifikasi (*nonkeratinizing*). Adanya kornifikasi menunjukkan derajat diferensiasi yang baik dan non-kornifikasi menunjukkan derajat diferensiasi yang jelek⁽³³⁾.

Berdasarkan Broders, derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa dibagi menjadi 4 sub tipe yaitu⁽³³⁾:

- diferensiasi baik (*well differentiated*)
- diferensiasi sedang (*moderately differentiated*)
- diferensiasi jelek (*poorly differentiated*), dan
- tidak terdiferensiasi (*undifferentiated*).

Derajat diferensiasi sel sangat penting karena umumnya derajat keganasan tumor sesuai dengan derajat diferensiasi sel. Semakin jelek sel berdiferensiasi, maka tumor tersebut semakin ganas.

Sistem *staging* secara komprehensif dapat memperbaiki kemampuan kita dalam memprediksi perilaku tumor kepala dan leher pada resiko tindakan bedah. Di masa mendatang, pemakaian sistem molekuler genetika atau marker biologi akan pula menambah nilai diagnostik dan prognosa penderita⁽²⁹⁾.

Kelenjar Getah Bening Regional

Status kelenjar getah bening regional dalam keganasan kepala leher merupakan prognostik yang penting. Namun pengetahuan mengenai sistem drainase limfatik traktus aerodigestivus belum seakurat dibanding sistem pembuluh darah. Penjelasan masalah metastasis limfogen lebih banyak menyangkut tingkat teori biologi dibanding kenyataan morfologis seperti distribusi dan padatnya pembuluh limfe regional. Belakangan ini diketahui

tendensi penyebaran metastasis limfogen secara langsung dipengaruhi oleh densitas pembuluh limfe dalam area tumor primer⁽³⁴⁾.

Prognosis penderita dengan keganasan banyak yang ditentukan oleh ekstensi ukuran tumor primer yang akhirnya menjadi potensi metastasis. Selama ini dianggap endotel limfatikus hanya berperan pasif dalam proses metastasis, dan invasi ke sistem limfatikus terjadi akibat tumor sudah menginfiltrasi stroma dan mengenai pembuluh limfe peritumoral⁽³⁴⁾.

Penambahan teknik limfografi indirek dengan zat warna atau dengan pelacak radioaktif, memudahkan kita melihat integrasi sistem limfatik traktus aero-digestif atas dalam sistem limfatik servikal^(34,35).

Pembuktian perbedaan limfatik traktus aero-digestivus atas, bukan saja penting sehubungan dengan arah perjalanan dan frekuensi metastasis kelenjar getah bening, tapi juga merupakan aspek yang signifikan dalam menentukan tindakan diseksi leher yang dibutuhkan dalam penanganan karsinoma sel skuamosa kepala leher⁽³⁴⁾.

Kelenjar getah bening leher dibagi dalam tujuh level sebagai berikut^(2,30,34):

Level I: grup submental dan submandibular

Level II: grup jugularis atas

Level III: grup jugularis media

Level IV: grup jugularis bawah

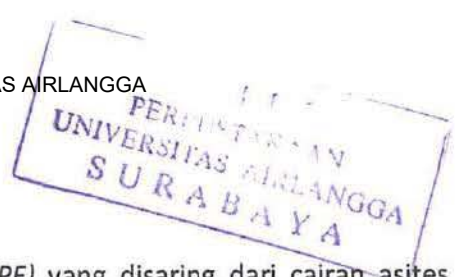
Level V: grup trigonum posterior (*spinal accessory and a.transverse cervical*)

(atas, tengah, dan bawah, berhubungan dengan level jugularis atas, media dan bawah)

Level VI: grup kompartemen anterior (grup visera): prelaringeal (*Delphian*), pre dan paratrakeal

Level VII: mediastinum anterior atas

Kelompok lain : sub-okspital, retrofaringeal, parafaringeal, businator (fasialis), preaurikula, periparotis dan intraparotis.



Vascular Endothelial Growth Factor

Awalnya dinamakan *vascular permeability factor (VPF)* yang disaring dari cairan asites mengandung sel tumor, dengan efek biologik memperlihatkan kemampuan mitogenesis sel endotel^(35,36).

VEGF dikenal sebagai peptida multi fungsi dalam menginduksi proliferasi sel endotel dan angiogenesis secara *in vivo* dan *in vitro*. *In vivo*, merupakan regulator angiogenesis yang poten. *In vitro*, menginduksi migrasi sel endotel, proliferasi dan ekspresi gen sel endotel⁽³⁶⁾.

VEGF berperan penting dalam perkembangan vaskuler embrio. Saat ini diketahui juga berimplikasi dalam neo vaskularisasi pada kondisi patologis seperti keganasan dimana tumor bergantung pada proses angiogenesis agar dapat meningkatkan vaskularisasi ke tumor tersebut sehingga dapat tumbuh dengan cepat⁽³⁶⁾.

Dengan struktur dasar *VEGF*, 45 kDa disulfida yang terikat pada glikoprotein dimerik, menggandeng heparin sehingga strukturnya mirip dengan *Platelet Derived Growth Factor*⁽³⁷⁾.

Kemampuan aktivitas *VEGF* akan hilang bila dilakukan pemisahan unit monomerik antara 17 dan 23 kDa. Keseluruhan anggota *VEGF* terakhir ini tercatat ada 5 dengan via mediator 3 reseptor *VEGF (VEGFR)*. Reseptor ini berkomunikasi dengan bagian dalam sel melalui reseptor transmembran tirosin kinase (*RTKs*)^{36,37)}

Macam *VEGF*

Dikenal keluarga *VEGF* yaitu *VEGF (VEGF-A)*, *Placenta growth factor(PlGF)*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E(VEGF homolog encoded Orf virus)*, dan *VEGF-like protein* dalam bisa ular^(37,38)

VEGF-A (VEGF) merupakan protein *VEGF* pertama yang diidentifikasi dikode dari kromosom 6p21.3. Rangkaian gen *VEGF* memanjang sampai 14kb, disandi dalam 8 ekson dan dibagi dalam 7 intron. Dengan melalui *mRNA splicing*, dihasilkan 6 *isoform*, dimana

perbedaannya adalah ada tidaknya ekson 6 dan 7, yaitu VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₉₃, VEGF₁₉₉, dan VEGF₂₀₆.^(35,36)

VEGF bukanlah angiogenesis tunggal, karena masih ada faktor lain yang turut terlibat seperti *angiogenin*, *interleukin 10 dan 8*, *platelet-derived endothelial growth factor*, *fibroblast growth factor*, *angiopoietins*, dan *thrombospondin*. Dalam beberapa penelitian terlihat adanya hubungan VEGF dengan biomarker utama lainnya seperti *COX-2*, *TP53*, *Ki-67*, namun secara keseluruhan ekspresi VEGF mempunyai prognosa yang signifikan pada penderita keganasan sel skuamosa kepala leher⁽³⁷⁾.

Regulasi ekspresi VEGF ditentukan oleh kondisi oksigen jaringan dan gula darah yang rendah. Pada kondisi hipoksik, maka VEGF mRNA akan terinduksi melakukan transkripsi gen (*hypoxia-inducible factor= HIF*), namun tidak berlaku untuk VEGF lainnya^(5,37).

Beberapa faktor pertumbuhan seperti *EGF*, *TGF*, *IGF*, *PDGF*, dapat meregulasi ekspresi VEGF mRNA, memberikan gambaran bahwa parakrin atau autokrin melepaskan faktor bekerja sama dengan VEGF dalam kondisi hipoksia lokal. Sitokin inflamasi seperti *IL-1* dan *IL-6* menginduksi VEGF dalam beberapa tipe sel termasuk fibroblast sinovial. Beberapa hormonal juga terlibat seperti *TSH* yang menginduksi ekspresi VEGF pada beberapa keganasan tiroid. Hormon lainnya adalah *ACTH*, gonadotropin, estradiol, progesterin⁽³⁷⁾.

VEGF_B ko-ekspresi dengan VEGF pada jaringan, terutama jaringan otot tubuh dan jantung. VEGF_{-C} dan _{-D} berbeda dengan yang lainnya dengan adanya rantai -N yang panjang dan ekstensi terminal -C, mempunyai afinitas yang kuat terhadap VEGFR-3 dan -2 yang dapat menginduksi baik proses limfangiogenesis maupun angiogenesis^(38,39).

VEGF_{-D} mRNA, pada jaringan manusia dewasa, sangat banyak pada jantung, paru, otot skeletal, kolon dan usus halus, dapat menginduksi pertumbuhan pembuluh limfatik yang baru

secara *in vivo*. Namun, walaupun punya aktivitas limfangiogenik, *VEGF-D* bukan bahan esensial untuk sistem perkembangan limfatik⁽³⁸⁾.

VEGF-C

VEGF-C dan *-D* berbeda dengan yang lainnya dengan adanya rantai *-N* yang panjang dan ekstensi terminal *-C*, mempunyai afinitas yang kuat terhadap *VEGFR-3* dan *-2* yang dapat menginduksi baik proses limfangiogenesis maupun angiogenesis^(38,39).

Merupakan ligan *VEGFR-3* yang pertama kali ditemukan, di mana *cDNA VEGF-C* dikloning dari sel kanker prostat. Kee dkk (1996) berhasil melakukan kloning *VEGF-C* dari sel glioma G61 manusia⁽⁴⁰⁾

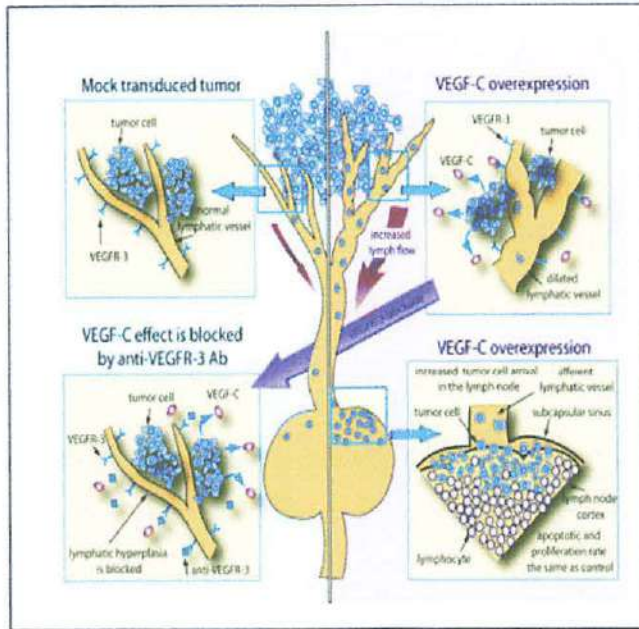
Terdiri dari sekitar 305 asam amino yang serupa dengan *VEGF₁₆₅*, terminal *-C* terdiri dari urutan ekstra sistein, berat molekul 23kDa protein, serupa juga dengan keluarga *PDGF*.

Pemetaan gen *VEGF-C* terhadap kromosom manusia pada 4q34, mendekati pemetaan gen aspartylglucosaminidase manusia pada kromosom 4q34 35.

VEGF-C diekspresi dalam sel neuroendokrin seperti sel-sel alfa dari islet Langerhans, sel penghasil prolaktin dari hipofise anterior, sel medulla suprarenal dan sel neuro endokrin traktus gastrointestinal dan dalam jumlah yang sedikit pada otak, hati.

Over ekspresi *VEGF-C* pada epidermis tikus transgenik, menimbulkan hiperplasi jaringan pembuluh limfatik. *In vitro*, *VEGF-C* menstimulasi migrasi dan mitogenesis sel endotel yang dikultur. Pada tikus coba dengan *veg* *-/-* didapatkan hipoplasi limfatik, mengindikasikan fungsi utama *VEGF-C* dalam proses limfangiogenesis. Namun mekanisme yang pasti belum dapat diketahui dengan jelas.

Ekspresi *mRNA VEGF-C* distimulasi oleh mutasi supresor p53, onkoprotein *Ras*, hipoksia, faktor-faktor pertumbuhan, *TNF-alfa* dan *IL 1-alfa*⁽⁴¹⁾.



Gambar 1. Overekspresi VEGF-C dan blokade anti VEGFR-3 Antibodi (dikutip dari Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science* 2005; 109:227–41

Reseptor

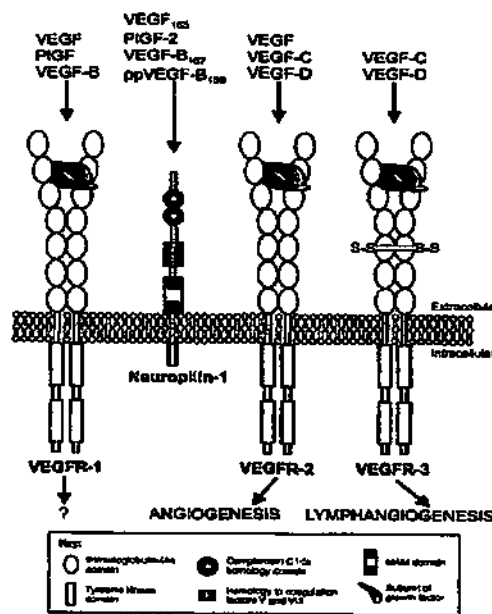
VEGF meregulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel endotel lewat tiga reseptor tirosin kinase : *VEGFR-1 (Flt-1)*, *VEGFR-2 (Flk-1 in mice, KDR in humans)*, *VEGFR-3 (Flt-4)*. Ketiganya predominan diekspresikan sel endotel dan memperlihatkan struktur dan fungsi mirip keluarga reseptor *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)*^(36,42).

VEGF-VEGF tersebut terikat pada *VEGFR* dengan spesifitas tumpang tindih. Seperti *VEGF-A* terikat baik pada *VEGFR-1* dan *VEGFR-2*. *PlGF* dan *VEGF-B* terikat hanya pada *VEGFR-1*, *VEGF-E* terikat hanya *VEGFR-2*. Secara umum, proses angiogenesis dimediasi lewat *VEGFR-1* dan *VEGFR-2*^(36,42).

VEGF-C dan *VEGF-D* terikat pada *VEGFR-3* melakukan mediasi signal pada endotel limfatik⁽³⁸⁾

Walaupun *VEGFR-2* dilaporkan dapat mengekspresi sel endotel limfatik *in vivo*, namun tidak esensial untuk limfangiogenesis. Namun, ternyata pada sepanjang proses limfangiogenesis dapat dilibatkan heterodimerisasi *VEGFR-2* dan *VEGFR-3*⁽⁴³⁾

Pada awal embriogenesis, *VEGFR-3* diekspresi pada semua sel endotel, setelah itu terjadi penurunan regulasi, awalnya pada arteri lalu vena. Selanjutnya, sepanjang pembentukan limfatik, *VEGFR-3* bertambah banyak dalam endotel limfatik, dan di luar bentukan limfatik, hanya terekspresi pada beberapa pembuluh darah fenestrasi. Signal *VEGFR-3* dibutuhkan untuk perkembangan normal vaskuler darah dan sistem limfatik. Menariknya, dalam salah satu penelitian terakhir ada indikasi bahwa penghambatan *VEGFR-3* pada jaringan dewasa dengan inhibitor spesifik dapat memblokir pertumbuhan limfatik baru tanpa mempengaruhi pembuluh limfe yang sudah ada atau angiogenesis⁽³⁸⁾.



Gambar 2. *VEGF-C* dapat menginduksi *VEGFR-2* dan *-3* sehingga terjadi proses angiogenesis dan limfangiogenesis (Dikutip dari Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002;16: 922-34)

Angiogenesis

Angiogenesis adalah proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang sebelumnya sudah ada. Angiogenesis berperan pada proses fisiologis, seperti pertumbuhan embrio, penyembuhan luka, dan siklus menstruasi, maupun pada proses patologis seperti aterosklerosis, artritis, retinopati diabetik, dan psoriasis. Pertumbuhan tumor solid bergantung pada proses angiogenesis dimana pembesaran diameter tumor memerlukan juga peningkatan vaskularisasi. Angiogenesis mempengaruhi perilaku tumor. Peningkatan angiogenesis ini berhubungan dengan kecenderungan tumor untuk bermetastasis, prognosis yang buruk, dan penurunan angka ketahanan hidup. *VEGF* merupakan suatu *angiogenic growth factor* yang kuat pada tumor. Pada suatu tumor dengan ekspresi *VEGF* yang tinggi, akan didapatkan proses angiogenesis yang berlangsung lebih hebat sehingga terjadi pertumbuhan dan metastase yang lebih cepat^(36,37).

Proses angiogenesis terdiri dari beberapa tahap yaitu degradasi *ECM* (*Extracellular matrix*), kemotaksis, migrasi dan proliferasi sel endotel. Pada proses angiogenesis tumor, tidak terjadi tahap maturasi sehingga kualitas pembuluh darahnya berbeda dengan pembuluh darah normal.

Degradasi *ECM* membutuhkan enzim *urokinase plasminogen activator (uPA)* dan matriks metaloproteinase yang dihasilkan oleh *growth factor* seperti *VEGF* dan *FGF*, juga akan merangsang migrasi, proliferasi dan invasi sel endotel. Proses kemotaksis dimulai dengan migrasi sel endotel melalui *ECM* yang telah terdegradasi. Makrofag yang berperan penting dalam proses kemotaksis tersebut diaktivasi oleh tumor melalui pembentukan *macrophage chemotactic factor (MCP1,2,3)* dan *VEGF* yang juga merupakan suatu *chemotactic factor*. Selanjutnya makrofag yang telah teraktivasi tersebut berperan dalam proses angiogenesis. Aktivasi sel endotel oleh

makrofag selain melalui *FGF* dan *VEGF*, juga melalui *IL-8* dan *tumor necrosis factor (TNF α)*.

Pada tahap migrasi sel endotel diperlukan peran integrin, dimana integrin $\alpha v\beta 3$ dan $\alpha v\beta 35$ berfungsi sebagai suatu *cell adhesion molecules* yang mempermudah sel endotel untuk melakukan migrasi setelah *ECM* tersebut mengalami degradasi pada tahap sebelumnya^(37,40).

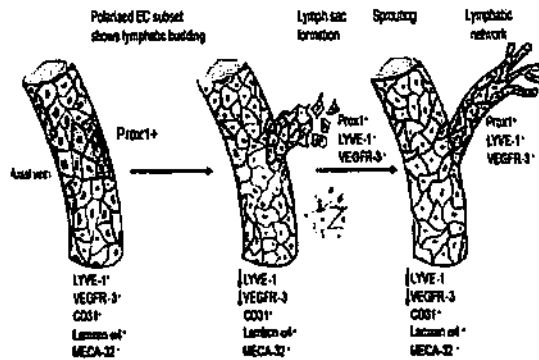
VEGF bukanlah satu-satunya faktor yang berperan dalam proses angiogenesis. Sampai saat ini, sudah ada 12 *growth factor* yang ditemukan antara lain *Fibroblast Growth Factor(FGF)*, *Angiogenin*, *Transforming Growth Factor(TGF)*, *Tumor Necrosis Factor (TNF)*, *Platelet-Derived Endothelial-cell Growth Factor(PDGF)*, *Placental growth factor (PGF)*. Namun *Fibroblast Growth Factor (FGF)* dan *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* merupakan protein proangiogenik tersering yang ditemukan pada tumor⁽³⁶⁾.

Limfangiogenesis

Sistem limfatik terdiri dari jaringan yang sangat ekstensif dari kapiler, penampung, saluran, meliputi sebagian besar organ tubuh. Pembuluh limfatik berperan penting dalam penyaluran cairan tubuh seperti protein plasma dan sel, kembali ke sirkulasi darah utama. Sistem limfatik juga berperan dalam sistem kekebalan dan penyerapan lemak dari saluran cerna. Kapiler limfatik merupakan pembuluh akhir-buntu (*blind-ended*), mengandung sejumlah besar pori-pori inter endotel yang banyak, tidak mengandung perisit dan basal lamina yang kontinu. Kapiler limfatik diikat filamen yang menghubungkan saluran dengan maktriks ekstraseluler, dan berfungsi mempertahankan patensi pembuluh selama peningkatan tekanan jaringan^(38,44).

Pembuluh limfatik dibentuk lewat proses limfangiogenesis, pada manusia, kantong limfe pertama ditemukan pada usia 6-7 minggu embrio, kurang lebih sebulan setelah terbentuknya pembuluh darah pertama. Sel endotel limfatik berdiferensiasi dan menyebar keluar dari vena

jugularis untuk membentuk kantung limfe primitif. Selanjutnya membentuk pembuluh limfe perifer melalui penyebaran sentrifugal dari kantung-kantung limfe ini. Penyebaran, penyatuan dan regresi selalu terjadi dalam proses limfangiogenesis seperti halnya dalam angiogenesis⁽³⁸⁾.

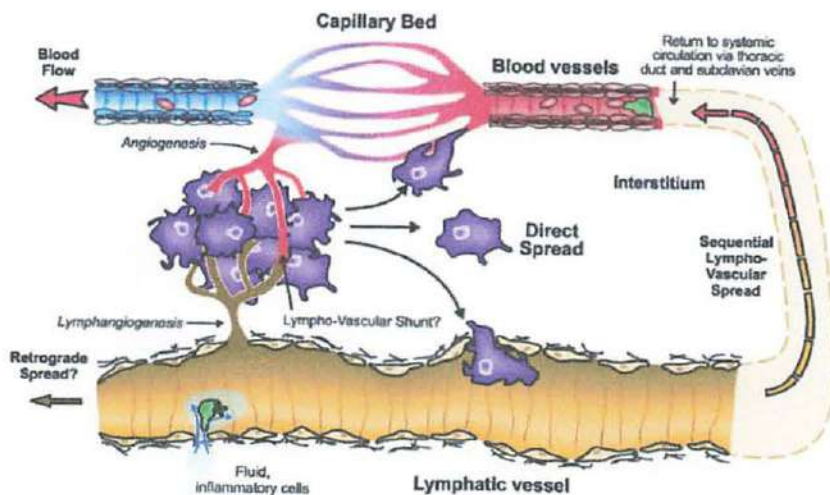


Gambar 3. Penonjolan pada pembuluh limfe untuk memulai proses limfangiogenesis. (Dikutip dari Dictor M, Mebrahtu S, Selg M, Lokmic Z, Sorokin L. Lymphatic origin from embryonic stem cells. in: Leong SPL, editor. Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy. New York: Springer; 2006.p.15-36

Belumlah jelas diketahui bagaimana suatu tumor dapat menyebar melalui saluran limfatik. Walau sudah jelas proses via hematogen, namun belum dapat dipastikan apakah suatu tumor juga dapat menginduksi limfangiogenesis atau hanya sekedar melewati pembuluh peritumoral saja⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾.

Pertumbuhan tumor sangat tergantung pada interaksi yang aktif dengan pembuluh darah jaringan sehat sekitarnya. Densitas tinggi dari pembuluh mikro tumor merupakan resiko tinggi terjadinya metastasis hematogen. Pada kasus keganasan, status kelenjar getah bening merupakan indikator prognostik untuk hasil akhir penderita. Namun pada dekade sebelumnya, masih disangkal bahwa keganasan tersebut dapat menginduksi proses limfangiogenesis, dan tetap menjadi perdebatan walau positif didapatkan adanya limfangiogenesis. Beberapa penelitian terbaru sudah melaporkan ada korelasi antara ekspresi faktor limfangiogenik (VEGF-C dan -D) dan densitas pembuluh limfe atau metastase ke kelenjar getah bening. Dalam uji

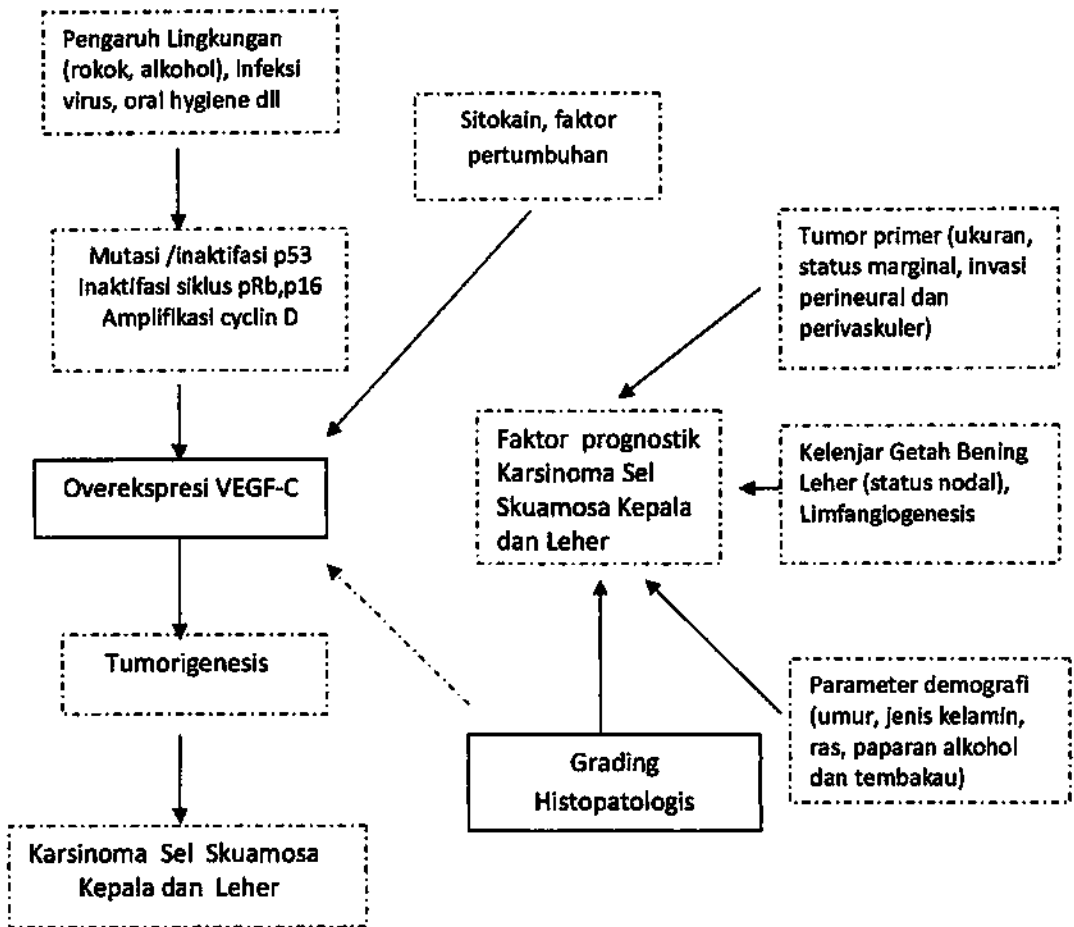
coba pada membran sel embrio hewan coba yang dikerjakan Wilting dkk, dengan perlakuan pemberian *VEGF-A* dan *VEGF-C-expressing human A375 melanoma cells*, didapatkan proses yang berbeda yaitu *VEGF-C* merangsang proses limfangiogenesis secara kuat dan hemangiogenesis ringan. Kemudian dilakukan penghambatan terhadap *VEGF-C* maka proses penyebaran atau metastase menjadi inaktif. Sedangkan pada *VEGF-A* yang merupakan faktor hemangiogenik, apabila dihambat, dapat mengurangi formasi kepadatan tumor, namun tidak mencegah interaksi sel tumor dengan jaringan sekitar dan pembentukan metastase^(47,49).



Gambar 4. Sel tumor meninggalkan tumor primer dan menyebar langsung ke jaringan sekitar, menginvasi pembuluh darah atau limfe. Sel tumor juga membentuk jalur alternatif dengan pembentukan pembuluh darah baru (angiogenesis) atau pembuluh limfe yang baru (limfangiogenesis), yang diinduksi faktor asosiasi angiogenik maupun limfogenik. (Dikutip dari Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002;16: 922-34)

BAB 4

KERANGKA KONSEPTUAL



: diteliti



Pemilihan pemeriksaan ekspresi *VEGF-C* dilakukan karena sifat *VEGF-C* yang mampu bekerja terutama pada proses limfangiogenesis melalui *VEGFR-3* maupun proses angiogenesis melalui *VEGFR-2*. Yang diketahui sampai saat ini, faktor yang berperan dalam proses limfangiogenesis adalah *VEGF-C* dan *-D*. Namun *VEGF-D* yang berkerja lewat *VEGFR-3*, tidak berperan dalam proses angiogenesis sebagaimana *VEGF-C*. Karena sampai saat ini, proses angiogenesis masih dianggap faktor yang berperan penting dalam pertumbuhan dan penyebaran tumor, maka pemilihan pemeriksaan *VEGF-C* sudah mencakup aspek keterlibatan angiogenesis dan limfangiogenesis, juga meringankan beban dibanding memeriksa *VEGF-A* bersama *VEGF-C* atau *-D*.

Pada penelitian awal ini hanya difokuskan untuk melihat ada tidaknya hubungan antara ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi sel skuamosa kepala dan leher, sehingga tidak dilibatkan multi variabel seperti parameter status kelenjar getah bening, status tumor TNM, status pola hidup dan lain-lain. Diharapkan penelitian lebih lanjut di waktu yang akan datang dengan melibatkan parameter lainnya dapat dilakukan bila penelitian ini memberikan hasil yang bermakna dan dapat ditindaklanjuti.

BAB 5

METODE PENELITIAN

5.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui peningkatan ekspresi *VEGF-C* pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, serta korelasi antara peningkatan ekspresi *VEGF-C* dengan berbagai *grading* histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Pengamatan dilakukan dengan sesaat pada variabel-variabel yang peristiwanya telah terjadi. Rancangan penelitian yang digunakan adalah retrospektif diagnostik test dengan pendekatan *cross sectional*.

5.2 Populasi

Populasi penelitian adalah semua blok parafin yang tersimpan di Departemen Patologi Anatomi FK Unair/RSU Dr Soetomo, yang secara klinis dan histopatologis menunjukkan gambaran karsinoma sel skuamosa kepala leher.

5.3. Sampling

Sampel penelitian adalah blok parafin penderita yang telah dioperasi di RSU Dr. Soetomo Surabaya selama periode 2006-2008 yang secara histopatologis menunjukkan karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan berbagai derajat diferensiasi.

5.3.1 Besar sampel

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

$$n = \left(\frac{Z_{1/2\alpha} + Z_{\beta}}{0,5 \ln \frac{(1+r)}{(1-r)}} \right)^2 + 3$$

$$Z_{1/2\alpha} 0,05 = 1,96$$

$$Z_{\beta} 0,20 = 0,842$$

$$r = 0,5$$

$$n = \left(\frac{1,96 + 0,842}{0,5 \ln \frac{(1+0,5)}{(1-0,5)}} \right)^2 + 3$$

$n = 29,05$ dibulatkan menjadi 30

5.3.2 Pengambilan sampel

Sampel dipilih secara *simple random sampling* berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi kemudian diperiksa secara imunohistokimia ekspresi *VEGF-C*.

5.4 Kriteria Bahan Penelitian

5.4.1 Kriteria inklusi

5.4.1.1 Kasus primer aero-digestivus atas yaitu karsinoma laring, karsinoma bukal, karsinoma sino nasal, karsinoma lidah, karsinoma nasofaring, karsinoma maksila, karsinoma palatum, karsinoma labial

5.4.1.2 Belum pernah radiasi dan kemoterapi pre-operatif.

5.4.1.3 Blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher yang tersimpan dengan baik pada suhu kamar di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSU Dr Soetomo Surabaya.

5.4.2 Kriteria eksklusi

5.4.2.1 Bukan kasus karsinoma laring, karsinoma bukal, karsinoma sino nasal, karsinoma lidah, karsinoma nasofaring, karsinoma maksila, karsinoma palatum, karsinoma labial

5.4.2.1 Sudah pernah radiasi dan kemoterapi pre-operatif

5.5. Variabel Penelitian

Pada penelitian ini variable penelitian yang diteliti adalah:

5.5.1 Variabel *independent* : ekspresi *VEGF-C*.

5.5.2 Variabel *dependent* : *grading* histopatologis

5.6 Definisi operasional

5.6.1 Ekspresi *VEGF-C*

Merupakan ekspresi protein *VEGF-C*, dimana ekspresinya dapat dilihat dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia terhadap tumor yang sitoplasma sel tercat positif dengan menggunakan *VEGF-C Polyclonal Antibody (BioVision)*. Ekspresi *VEGF-C* ditunjukkan dalam skala prosentase sel tumor yang positif dan dinilai secara semikuantitatif dengan skor :

- 0 : Bila tidak tampak area yang positif pada pengecatan terhadap VEGF-C atau 0% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- +1 : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap VEGF-C dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x kurang dari 10%
- +2 : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap VEGF-C dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x antara 10 – 50%
- +3 : Bila rata-rata area yang positif pada pengecatan terhadap VEGF-C dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x lebih dari 50%
- Pemeriksaan ini dilakukan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSU Dr Soetomo Surabaya.

5.6.2 Grading histopatologi

Karsinoma sel skuamosa ditentukan *gradenya* menurut sistem Broder menjadi 4 subtype berdasarkan diferensiasi histologinya yaitu

5.6.2.1 Well Differentiated

5.6.2.2 Moderately Differentiated

5.6.2.3 Poorly Differentiated

5.6.2.4 Undifferentiated.

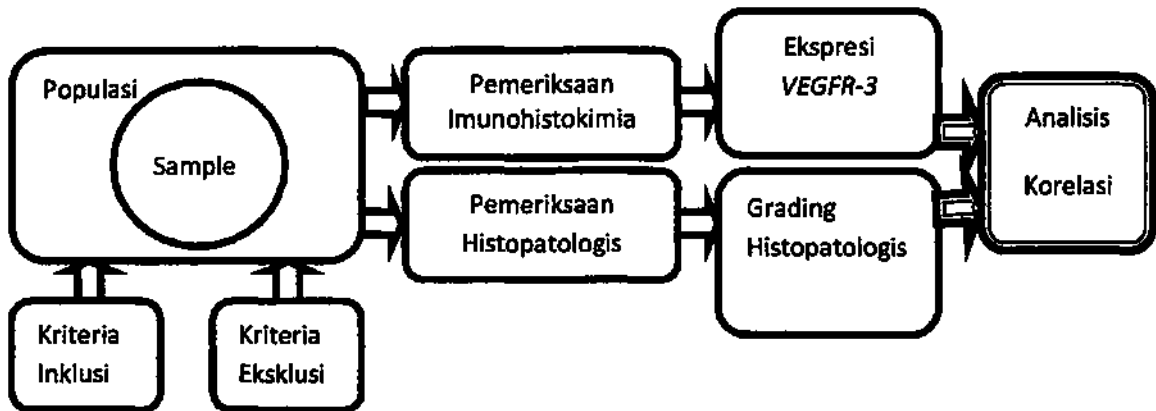
Tabel 2. Grading histopatologis karsinoma sel skuamosa menurut sistem Broder

	<i>Well Differentiated</i>	<i>Moderately Differentiated</i>	<i>Poorly Differentiated</i>	<i>Undifferentiated</i>
Diferensiasi sitoplasmik	>50% mengalami keratinisasi	20-50% mengalami keratinisasi	5-20% mengalami keratinisasi	<5% mengalami keratinisasi
Polimorfisme inti sel	>75% Sel matur	50-75% Sel matur	25-50% Sel matur	<25% Sel matur
Jumlah mitosis	Tunggal (0-1)	Sedang (2-3)	Banyak (4-5)	Sangat banyak (>5)

Dikutip dari Starska K, Kulig A. Tumor front grading in prediction of survival and lymph node metastase in patients with laryngeal carcinoma. *Advances in Medical Sciences*, 2006; 51:201.

Pada penelitian ini akan diteliti intensitas ekspresi *VEGF-C* secara imunohistokimia pada berbagai derajat diferensiasi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher. Pemeriksaan histopatologi ini dilakukan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr. Soetomo Surabaya.

5.7 Kerangka Operasional



5.8 Lokasi dan Waktu Penelitian

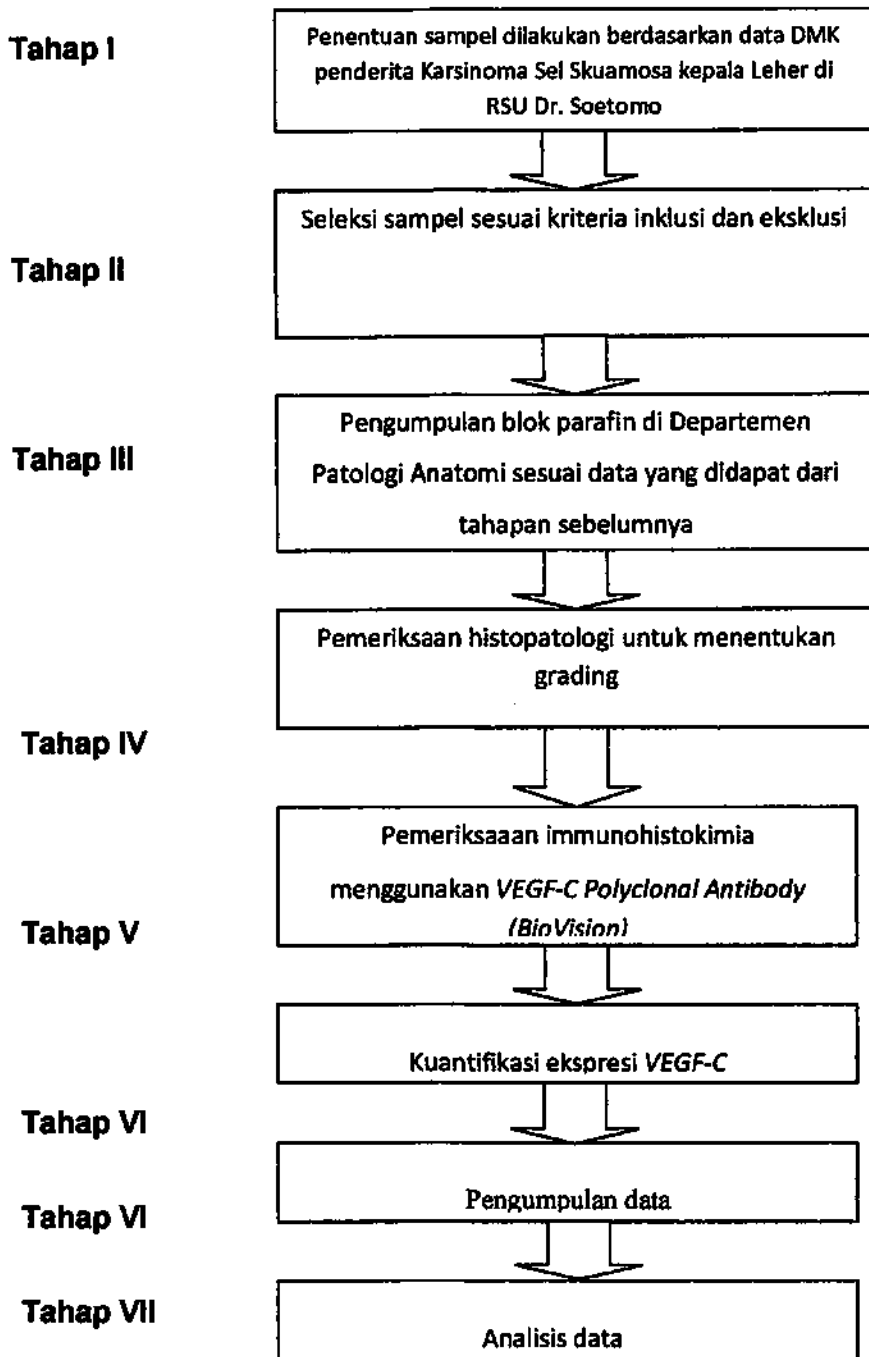
5.8.1 Lokasi

Dilakukan di poli Bedah Kepala Leher dan Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSU Dr. Soetomo Surabaya.

5.8.2 Waktu penelitian

Selama 3 bulan sejak pengumpulan sampel sampai analisa data.

5.9 Tahap Penelitian



BAB 6

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

6.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Sampel diambil secara random sampling pada seluruh blok parafin penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher di RSUD Dr. Soetomo Surabaya bulan Januari 2006 – Juli 2008. Sampel yang memenuhi syarat terkumpul sebanyak 32 buah blok parafin.

Tabel 3. Karakteristik sampel penelitian

	Grading Histopatologi				Total n=32
	Well Differentiated n=9	Moderate Differentiated n=8	Poorly Differentiated n=8	Undifferen- tiated n=7	
Umur					
Jenis Kelamin					
- Laki-laki	8(34,8%)	7(30,4%)	4(17,4%)	4(17,4%)	23(100,0%)
- Perempuan	1(11,1%)	1(11,1%)	4(44,4%)	3(33,3%)	9(100,0%)

Tabel 4. Distribusi jenis kelamin dan umur pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Umur (tahun)	Jenis Kelamin				Jumlah (%)
	Laki-laki (%)		Perempuan (%)		
0-9	0	(0,0)	1	(100)/(11,1)	1 (100)/(3,1)
10-19	0	(0,0)	0	(0,0)	0 (0,0)/(0,0)
20-29	0	(0,0)	0	(0,0)	0 (0,0)/(0,0)
30-39	4	(66,7)/(17,4)	2	(33,3)/(22,2)	6 (100)/(18,7)
40-49	3	(42,9)/(13,0)	4	(57,1)/(44,5)	7 (100)/(21,9)
50-59	7	(100)/(30,4)	0	(0,0)	7 (100)/(21,9)
60-69	6	(87,7)/(26,1)	1	(14,3)/(11,1)	7 (100)/(21,9)
>70	3	(75) / (13,0)	1	(25) / (11,1)	4 (100)/(12,5)
Jumlah (%)	23	(71,9)/(100)	9	(28,1)/(100)	32 (100)/(100)

Jenis kelamin terbanyak pada penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher yang menjadi subyek penelitian ini adalah laki-laki, sebanyak 23 orang (71,9%). Umur penderita pada penelitian ini antara 3 tahun sampai dengan 86 tahun, dengan rata-rata 52,31 tahun.

Kelompok yang terbanyak adalah pada umur 40-49, 50-59 dan 60-69 tahun yaitu masing-masing 7 orang (21,9%). Laki-laki mendominasi kelompok usia 50-59 tahun dan 60-69 tahun yaitu sebanyak 7 orang (30,4%) dan 6 orang (26,1%). Sedangkan pada kelompok umur 40-49 tahun lebih banyak wanita yaitu 4 orang (44,4%).

Tabel 5. Distribusi umur, kelamin, grading histopatologis serta ekspresi VEGF-C penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Umur (tahun)	Grading Histopatologi								Total		
	Well differentiated		Moderately Differentiated		Poorly Differentiated		Undifferentiated		Laki-laki	Wanita	
	Laki-laki	Wanita	Laki-laki	Wanita	Laki-laki	Wanita	Laki-laki	Wanita			
0-9	0	0	0	0	0	0	0	1(100%) 1(+2)	0	1(100%)	1(100%)
10-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20-29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30-39	0	1(16,7%) 1(+2)	0	0	2(33,3%) 2(+2)	0	2(33,3%) 1(+1) 1(+2)	1(16,7%) 1(+1)	4(66,7%)	2(33,3%)	6(100%)
40-49	2(28,6%) 2(+1)	0	0	0	0	3(42,9%) 3(+2)	1(14,3%) 1(+3)	1(14,3%) 1(+3)	3(42,9%)	4(57,1%)	7(100%)
50-59	2(28,6%) 2(+1)	0	4(57,1%) 4(+2)	0	1(14,3%) 1(+2)	0	0	0	7(100%)	0	7(100%)
60-69	3(42,9%) 2(+1) 1(+2)	0	1(14,3%) 1(+2)	0	1(14,3%) 1(+2)	1(14,3%) 1(+2)	1(14,3%) 1(+2)	0	6(85,7%)	1(14,3%)	7(100%)
>70	1(25%) 1(+1)	0	2(50%) 2(+2)	1(25%) 1(+2)	0	0	0	0	3(75%)	1(25%)	4(100%)
Total	8(25%)	1(3,1%)	7(21,9%)	1(3,1%)	4(12,5%)	4(12,5%)	4(12,5%)	3(9,4%)	23(71,9%)	9(28,1%)	32(100%)

Dari tabel 5 tampak kelompok laki lebih banyak pada grading *well differentiated* (25%) dan berkurang berturut-turut pada *moderately*(21,9%), *poorly* (12,5%) dan *undifferentiated* (12,5%). Berbeda dengan kelompok wanita yang cenderung meningkat mulai dari grading *well differentiated* (3,1%), *moderately*(3,1%), *poorly*(12,5%), sedikit menurun pada *undifferentiated* (9,4%). Perbandingan antara kelompok laki-laki dan wanita memperlihatkan semakin kecil bila grading histopatologis semakin buruk.

Tabel 6. Diagnosis klinis dan grading histopatologis penderita karsinoma sel skuamosa kepala leher

No	Diagnosis Klinis	Grading Histopatologis				Total (%)
		Well Differentiated (%)	Moderate Differentiated (%)	Poorly Differentiated (%)	Undifferentiated (%)	
1	Ca Laring	5(50,0)	3(30,0)	2(20,0)	-	10(100,0)
2	Ca Lidah	3(60,0)	1(20,0)	1(20,0)	-	5(100,0)
3	Ca Nasofaring	-	-	1(12,5)	7(87,5)	8(100,0)
4	Ca Maksila	-	1(33,3)	2(66,7)	-	3(100,0)
5	Ca SinoNasal	-	1(33,3)	2(66,7)	-	3(100,0)
6	Ca bukal	1(100,0)	-	-	-	1(100,0)
7	Ca Labial	-	1(100,0)	-	-	1(100,0)
8	Ca Palatum	-	1(100,0)	-	-	1(100,0)
Total		9(28,1)	8(25,0)	8(25,0)	7(21,9)	32(100,0)

Diagnosis klinis yang terbanyak pada penelitian ini adalah karsinoma laring yaitu 10 orang dengan sebaran diferensiasi terutama pada yang diferensiasi baik. Pada karsinoma lidah, didapatkan lima sampel yang sebagian besar menunjukkan diferensiasi baik. Tiga sampel karsinoma sino nasal dan tiga sampel karsinoma maksila sebagian besar menunjukkan *poorly differentiated*. Hampir seluruh sampel karsinoma nasofaring menunjukkan gambaran tidak berdiferensiasi.

6.2. Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi VEGF-C pada Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher.

Hasil pemeriksaan ekspresi VEGF-C dikelompokkan berdasar skor yang didapat dari hasil ekspresi imunohistokimia. Pada penelitian ini tidak didapatkan hasil negatif pada ekspresi VEGF-C. Skor ekspresi VEGF-C terendah pada penelitian ini adalah +1 sebanyak sembilan sampel yang terdiri dari grading histopatologis *well differentiated* sebanyak tujuh

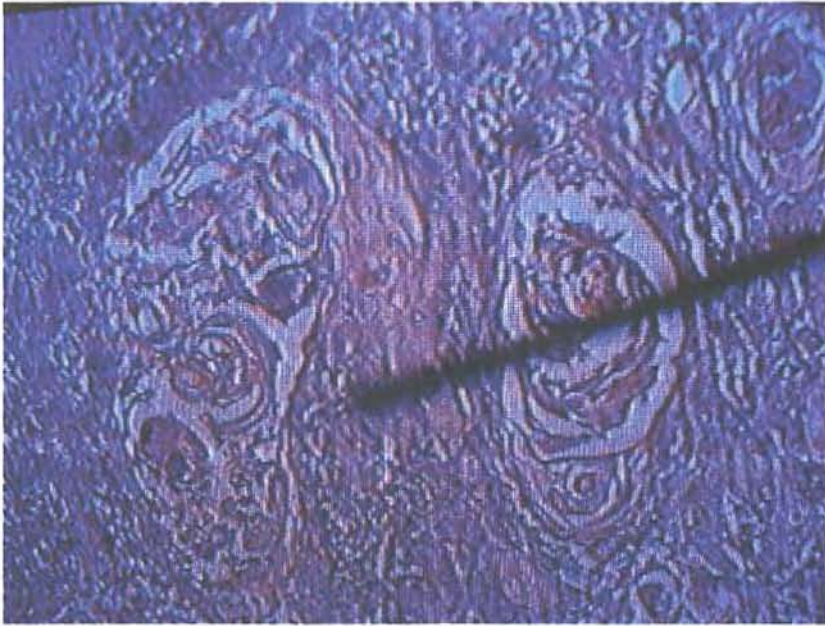
sampel (77,8%) dan dua sampel pada masing-masing grading *moderately* dan *undifferentiated*. Skor tertinggi adalah +3 didapatkan dua sampel dengan grading *undifferentiated*. Skor terbanyak adalah +2 sebanyak 21 sampel terutama pada grading *poorly differentiated* sebesar 38,1% dan diikuti grading *moderate* sebesar 33,3% . Bila dihitung berdasarkan kelompok grading histopatologi, maka grading *poorly differentiated* menempati 100% untuk skor +2, dibanding grading *undifferentiated* yang sangat bervariasi pencapaian skornya. (lihat tabel 7)

Secara keseluruhan, skor +2 dengan prosentasi antara 10%-50% sel yang tercat, memperlihatkan kenaikan nilai prosentasinya bila semakin buruk grading histopatologinya. Hal ini ditunjukkan oleh hasil pemeriksaan imunohistokimia VEGF-C untuk grading *poorly differentiated* rata-rata area yang positif tercat lebih banyak dibanding yang grading *moderately*. Demikian pula yang *undifferentiated* dibandingkan dengan *poorly differentiated* (lihat lampiran 3).

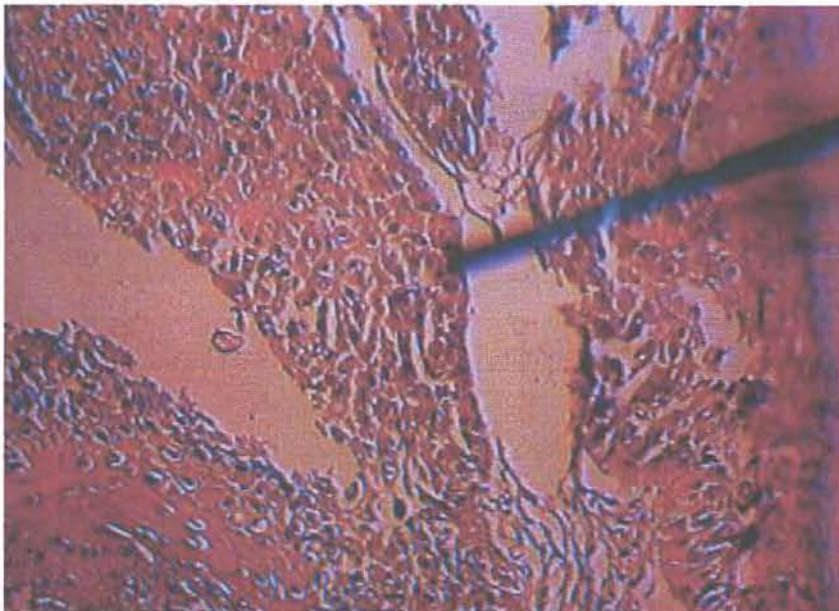
Tabel 7. Ekspresi VEGF-C

Ekspresi VEGF-C	Grading Histopatologi				Frekuensi (n=32)
	Well Differentiated n=9	Moderately Differentiated n=8	Poorly differentiated n=8	Undifferentiated n=7	
+1	7(77,8%)	1(11,1%)	-	1(11,1%)	9(100,0%)
+2	2(9,5%)	7(33,3%)	8(38,1%)	4(19,1%)	21(100,0%)
+3	-	-	-	2(100,0%)	2(100,0%)

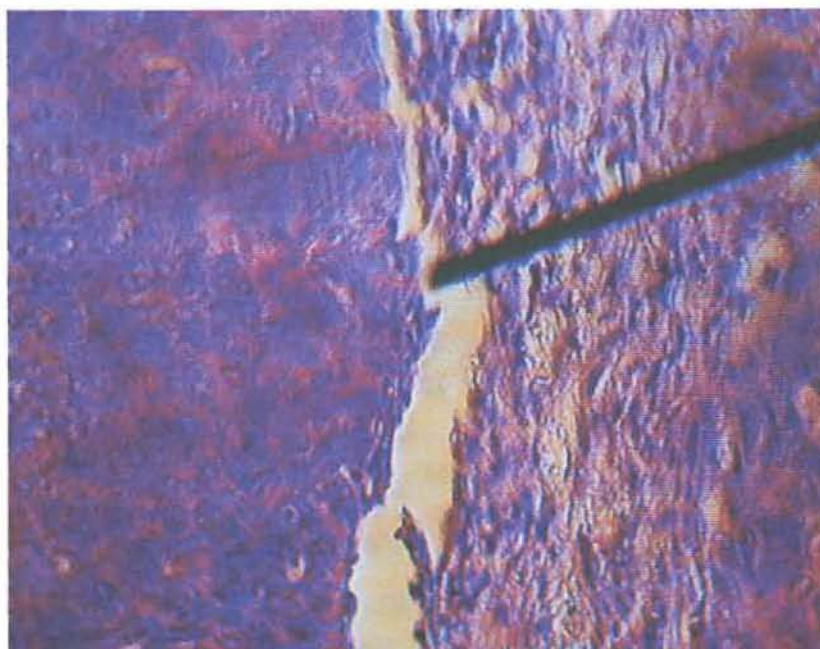
Gambar-gambar di bawah ini adalah contoh pemeriksaan ekspresi VEGF-C pada berbagai jenis karsinoma sel skuamosa kepala dan leher pada grading histopatologis yang berbeda dengan intensitas imunoreaktif yang berbeda-beda pula.



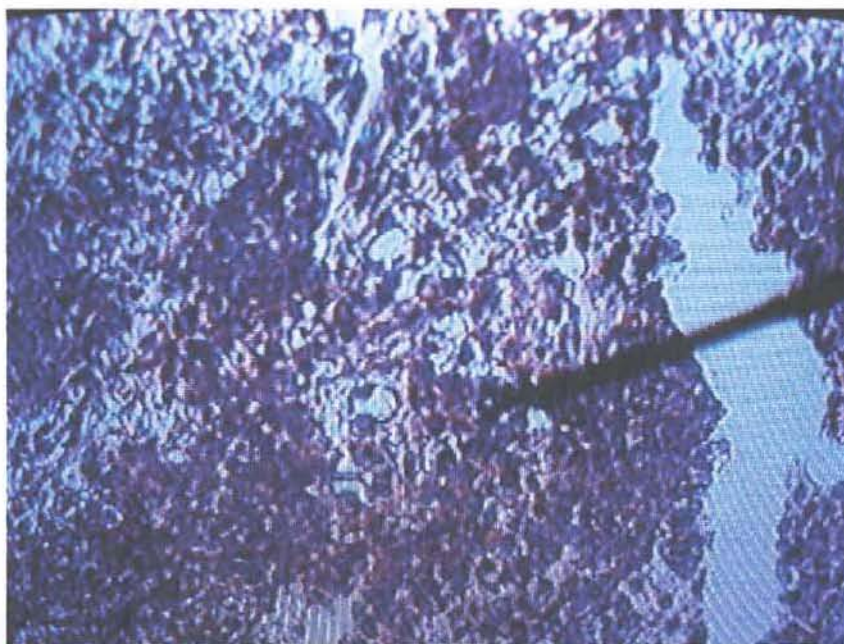
Gambar 5. Karsinoma laring (TIF5.2008/T.455 /2008) *well differentiated squamous cell carcinoma* di mana 10% dari sel-sel positif dengan VEGF-C (merah pada sitoplasma).Pembesaran 400 kali dengan mikroskop Olympus BX50.



Gambar 6. Karsinoma laring (TIF1/2008) / (T.455/2008) *moderately differentiated squamous cell carcinoma* di mana 25% dari sel-sel positif dengan VEGF-C. Pembesaran 200 kali dengan mikroskop Olympus BX50.



Gambar7. Karsinoma sino nasal (TiF15/2008)/(T.6335/07) *poorly differentiated squamous cell carcinoma*, menunjukkan 40% sel-sel positif pada pemeriksaan imunohistokimia dengan VEGF-C (sisi kiri) dan hasil negatif pada sisi kanan. Pembesaran 400x dengan mikroskop Olympus BX50.



Gambar 8. Karsinoma Nasofaring (TiF26/2008)(T.3604/08) *undifferentiated squamous cell carcinoma* dengan lebih dari 50% menunjukkan reaksi positif dengan VEGF-C pada pemeriksaan imunohistokimia (merah pada sitoplasma). Dilihat dengan mikroskop Olympus BX50 pada pembesaran 400 kali.

6.3 Analisis hasil penelitian

Hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan ekspresi *VEGF-C* mempunyai korelasi yang signifikan dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,614 (lihat tabel 8). Hal ini berarti bahwa semakin kuat intensitas ekspresi *VEGF-C* maka semakin jelek derajat diferensiasi sel (gambar 9).

Tabel 8. Uji Korelasi *Spearman* ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Correlations

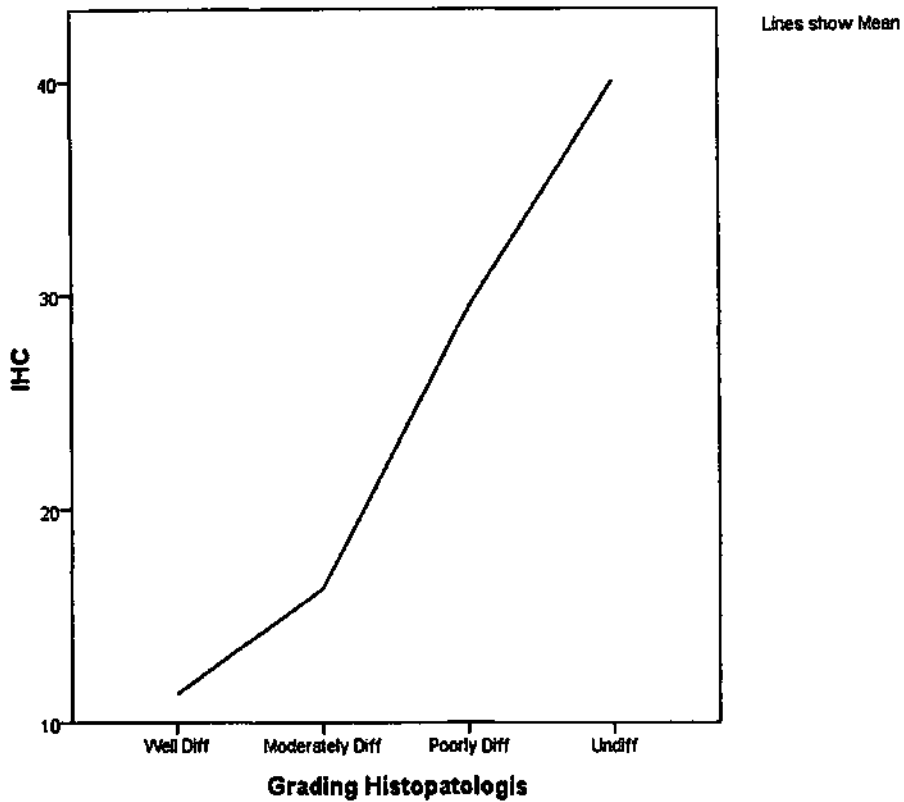
			GRADING	IMHK
Spearman's rho	GRADING	Correlation Coefficient	1,000	,614**
		Sig. (2-tailed)	,	,000
		N	32	32
	IMHK	Correlation Coefficient	,614**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	32	32

** . Correlation is significant at the .01 level (2-tailed).

Tabel 9. Tabulasi silang ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

IMHK * GRADING Crosstabulation

			GRADING				Total
			Well Diff	Moderately	Poorly	Undiff	
IMHK +1	Count	7	1		1	9	
	% within GRADING	77,8%	12,5%		14,3%	28,1%	
+2	Count	2	7	8	4	21	
	% within GRADING	22,2%	87,5%	100,0%	57,1%	65,6%	
+3	Count				2	2	
	% within GRADING				28,6%	6,3%	
Total	Count	9	8	8	7	32	
	% within GRADING	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	



Gambar 9 Grafik hubungan antara median skor ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher

Dari tabel di atas tampak hubungan median skor ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi di mana peningkatan skor imunohistokimia sebanding dengan tingkat grading histopatologis keganasan sel skuamosa kepala dan leher .

Penilaian hubungan antara ekspresi *VEGF-C* dengan masing-masing grading histopatologis (tes multivariat) tidak dapat dilakukan sehubungan dengan adanya homogenitas variabel grading histopatologis.

BAB 7

PEMBAHASAN

7.1 Gambaran umum hasil penelitian

Pada penelitian ini diperiksa 32 blok parafin karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan berbagai derajat diferensiasi yaitu *well differentiated*, *moderately differentiated*, *poorly differentiated* dan *undifferentiated*, masing-masing sebanyak 9 (28,1%), 8 (25,0%), 8 (25,0%) dan 7 (21,9%). Usia terbanyak yaitu kelompok rentang usia 40-49, 50-59 dan 60-69 tahun masing-masing 7 orang (21,9%). Untuk kelompok pria lebih banyak pada rentang usia 50-59 tahun yaitu 7 orang (30,4%), dan rentang usia 40-49 tahun untuk kelompok wanita sebesar 44,4%, yang sesuai dengan kepustakaan bahwa insiden karsinoma sel skuamosa kepala leher lebih banyak pada usia 40 tahun ke atas dengan puncaknya pada dekade kelima dan keenam. Dari jenis kelamin, karsinoma sel skuamosa kepala leher didapatkan lebih banyak pada laki-laki (71,9%) dari pada wanita (28,1%) dan hal ini sesuai dengan kepustakaan bahwa laki-laki lebih banyak menderita keganasan di kepala leher dibanding wanita. Rasio laki-laki dibandingkan perempuan lebih dari 2:1. Perbedaan rasio laki-laki dibanding perempuan lebih besar 4 sampai 5 kali pada laki-laki pada tumor-tumor laring, namun perbandingan ini mulai menurun sehubungan dengan kemungkinan peningkatan jumlah wanita perokok⁽²⁷⁾. Menurut D,Souza dkk(2005), justru wanita lebih banyak menderita karsinoma sel skuamosa pada kelompok bukan perokok dan bukan peminum (NSND)⁽²⁵⁾. Pada penelitian ini, kami tidak memasukkan variabel perilaku, sehingga tidak dapat disimpulkan ada-tidaknya hubungan variabel tersebut dengan angka kejadian keganasan kepala leher.

Pada kasus keganasan rongga mulut, yang terbanyak ditemukan adalah karsinoma sel skuamosa. Perubahan intra epitelial karsinoma sel skuamosa dapat

digolongkan ke dalam tingkatan ringan, sedang dan berat. Sistem yang digunakan secara luas dalam penentuan derajat diferensiasi mencakup tiga kategori:

(1) derajat diferensiasi baik, bila tumor tersebut terdiri dari sekumpulan besar sel-sel skuamosa dan sering kali terdapat fokus-fokus keratin yang berbentuk seperti mutiara, (2) derajat diferensiasi sedang, bila tumor terdiri dari sekumpulan sel-sel skuamosa yang lebih kecil dengan sel-sel yang pleomorfis dan aktifitas mitosis sedang, dan (3) derajat diferensiasi buruk, bila tumor terdiri dari sel-sel yang anaplastik dengan gambaran pleomorfisme dan mitosis yang prominen. Namun nilai klasifikasi histologis secara konvensional ini sudah menimbulkan pro dan kontra di antara kalangan peneliti. Bila hanya berpatokan pada satu klasifikasi saja yaitu secara mikroskopik, maka akan menghasilkan respon terapi dan *outcome* yang sangat rendah.⁽⁵⁰⁾

Dari 32 sampel yang diteliti, terbanyak kasus karsinoma laring 10 sampel (31,2%) dan karsinoma nasofaring sebanyak 8 sampel (25,0%) dengan derajat diferensiasi yang berbeda. Karsinoma laring sebagian besar menunjukkan derajat diferensiasi baik (50%) dibanding karsinoma nasofaring yang lebih banyak menunjukkan diferensiasi buruk (tabel 5). Sebagian besar karsinoma di rongga mulut menunjukkan derajat diferensiasi yang baik. Gale (2007) menyatakan sebagian besar karsinoma laring mempunyai derajat diferensiasi baik sampai sedang. Variasi derajat diferensiasi sering kali didapatkan dalam satu tumor, tetapi dalam penentuan derajat diferensiasi harus didasarkan pada daerah yang mempunyai diferensiasi terburuk. Pada penelitian ini didapatkan karsinoma laring berdiferensiasi baik 5(50,0%), sedang 3(30,0%) dan buruk 2 (20,0%).

Karsinoma sino nasal adalah tumor yang terletak di vestibulum nasi dan sinus-sinus paranasalis. Karsinoma ini dapat berasal dari berbagai jenis sel. Karsinoma sel skuamosa adalah yang paling sering didapatkan dan biasanya mempunyai derajat diferensiasi buruk dan tidak berdiferensiasi (*undifferentiated*). Karsinoma sino nasal yang tidak berdiferensiasi mempunyai derajat keganasan yang tinggi. Dari namanya menunjukkan bahwa tumor ini tidak menunjukkan gambaran epitel skuamosa. Pada pemeriksaan histopatologi hanya didapatkan sel-sel yang anaplastik dengan rasio inti sel yang lebih besar dan aktifitas mitosis yang tinggi⁽⁵¹⁾ Pada penelitian ini didapatkan 3 (%) kasus karsinoma sinonasal dengan diferensiasi yang sedang 1 (33,3%) dan diferensiasi buruk 2(66,7%) yang kesemuanya adalah wanita usia rata-rata 43,5 tahun.

Karsinoma nasofaring adalah karsinoma sel skuamosa yang sering terjadi pada usia dekade keempat sampai dengan dekade keenam. Karsinoma ini mempunyai tiga varian yaitu: (1) Keratinizing, karsinoma sel skuamosa konvensional, (2)Non keratinizing, berdiferensiasi, dan(3) Non keratinizing non diferensiasi. Terbanyak adalah bentuk karsinoma nasofaring non keratinizing non diferensiasi⁽⁵¹⁾ Pada penelitian ini didapatkan 8 kasus (100%) karsinoma nasofaring dengan derajat diferensiasi buruk/ tidak berdiferensiasi. Rentang usia rata-rata 37,6 tahun dan perbandingan antara laki-laki dan wanita 5 : 3, menunjukkan kasus karsinoma nasofaring lebih banyak pada kasus dewasa muda, bahkan satu kasus usia 3 tahun. Menurut Gangane dkk (2007), didapatkan angka yang signifikan kasus keganasan oral pada usia muda namun hal ini ditengarai akibat pemakaian tembakau pada usia yang lebih dini. Pada kasus anak yang lebih kecil, kemungkinan faktor lingkungan, gizi, virus lebih berperan dalam keganasan nasofaring.⁽⁵²⁾

7.2 Korelasi antara Ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher.

Berdasarkan hasil pemeriksaan imunohistokimia, ekspresi *VEGF-C* secara semikuantitatif didapatkan pada seluruh penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan ekspresi dan intensitas imunostaining yang berbeda-beda sesuai dengan derajat diferensiasinya.

Pada penelitian ini untuk karsinoma sel skuamosa yang berdiferensiasi baik sebagian besar menunjukkan intensitas imunoreaktivitas rendah sedangkan untuk derajat diferensiasi buruk menunjukkan imunoreaktivitas sedang sampai kuat. (lihat lampiran 3). Dari hasil pemeriksaan pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada derajat diferensiasi yang buruk maka intensitas *immunostaining* akan semakin kuat.

Pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini menunjukkan korelasi yang bermakna antara ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,614. Secara jelas korelasi ini dapat dilihat pada grafik hubungan antara median skor ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi karsinoma sel skuamosa kepala dan leher (gambar 8). Dari grafik tersebut terlihat jelas bahwa semakin kuat ekspresi *VEGF-C* maka semakin jelek derajat diferensiasi sel. Namun terlihat untuk grading *undifferentiated* tidak seluruhnya memberikan ekspresi *VEGF-C* karena masih ada faktor lain yang mempengaruhi seperti penyediaan preparat dan cara melakukan *immunostaining*.

Gallo dkk (2001) mendapatkan adanya korelasi yang signifikan dengan 80% sampel yang positif dan ekspresi tersebut semakin kuat pada kasus dengan kelenjar

getah bening positif dibanding yang negatif⁽⁵³⁾. Menurut Neuchrist dkk (1999) didapatkan 80% sampel yang positif dan ekspresinya semakin kuat pada grading yang buruk. Namun tidak didapatkan hubungan ekspresi tersebut dengan staging tumor maupun status limfonodus⁽⁵⁴⁾. Oleh Lim S dkk (2003), ekspresi *VEGF* mencapai 98% dan didapatkan adanya korelasi kuat dengan prognosa yang buruk⁽⁵⁵⁾. Pada penelitian Ding dkk(2006), ekspresi *VEGF-C* mRNA berkorelasi signifikan dengan metastasis limfonodus, TNM.⁽⁵⁶⁾

Pada penelitian ini, kecuali nilai ekspresi *VEGF* dan grading histopatologis, tidak dapat disimpulkan adanya hubungan dengan status kelenjar getah bening dan metastasis karena memang variabel tersebut tidak dilibatkan sejak awal. Diharapkan pada penelitian lebih lanjut di waktu yang akan datang, variabel yang lebih luas dapat diikutsertakan.

7.3. Aplikasi klinis *VEGF-C*

VEGF-C dapat dipakai sebagai petanda prognostik sesuai hasil penelitian Uehara dkk, yang mendapatkan korelasi ekspresi *VEGF-C* yang signifikan dengan prognosa buruk⁽⁵⁷⁾. Ekspresi yang tinggi akan meningkatkan angka relaps.⁽⁵⁸⁾ Proses limfangiogenesis tumor dan metastasis ke limfonodus regional dapat disupresi dengan penghambatan *VEGF-C* melalui *VEGFR-3*⁽⁵⁹⁾.

7.4. Hubungan *VEGF-C* dengan faktor prognostik lain

Pada penelitian Kodama dkk (2008) didapatkan hubungan antara *VEGF-C* dengan *cyclin D1* dimana *VEGF-C* meningkatkan ekspresi *mRNA encoding cyclin D1*, dan *placental growth factor*.⁽⁶⁰⁾

Oleh Riedel dkk(2000) didapatkan hubungan yang signifikan antara mutasi p53 dengan ekspresi *VEGF* pada keganasan sel skuamosa kepala leher dan mendukung hipotesis keikutsertaan p53 dalam regulasi angiogenesis.⁽⁶¹⁾

Pada penelitian Cicco dkk (2004) didapatkan *VEGF-C* merupakan faktor yang sangat mempengaruhi *survival* dan metastasis kelenjar getah bening regional di mana *VEGF-C* meningkatkan *MVD (microvessel density)* limfatik.^(53,62)

7.5. Korelasi ekspresi *VEGF-C* pada tumor lainnya

Pada keganasan tiroid tipe papiler, didapatkan hubungan signifikan antara ekspresi *VEGF-C* dengan metastasis limfonodus dan ekspresi *COX-2* terutama pada penderita usia tua.⁽⁶³⁾

Pada keganasan prostat, didapatkan peningkatan ekspresi *VEGF-C* yang signifikan berkorelasi dengan metastasis kelenjar getah bening.⁽⁶⁴⁾

Pada penelitian Skobe dkk(2001) pada keganasan payudara didapatkan korelasi ekspresi *VEGF-C* dengan peningkatan limfangiogenesis intra tumoral, metastasis ke kelenjar getah bening regional dan ke paru.⁽⁶⁵⁾

Demikian pula pada karsinoma lambung, didapatkan korelasi peningkatan ekspresi *VEGF-C* dan derajat keganasan lambung. Pada uji coba tersebut oleh Kodama dkk(2008) tersebut, progresivitas keganasan lambung distimulasi secara bermakna oleh *VEGF-C*⁽⁶⁰⁾.

7.6. Peran fiksasi jaringan dan prosedur teknik dalam pemeriksaan imunohistokimia *VEGF-C*

Hasil pemeriksaan imunohistokimia tidak terlepas dari berbagai faktor yang

turut mempengaruhi hasil akhir yaitu proses preparasi jaringan sampai pengecatan imunohistokimia yang kurang sempurna. Pemeriksaan imunohistokimia adalah salah satu prosedur pemeriksaan histopatologi untuk mendeteksi adanya antigen tertentu pada potongan jaringan dengan adanya reaksi antigen-antibodi menggunakan antibodi yang sudah diberi label.

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

Morfologi jaringan harus dipertahankan dengan jalan fiksasi jaringan dengan segera dan adekuat. Pada 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 spesimen operasi harus segera dimasukkan ke bahan fiksasi karena 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 atau hipertonis.⁽⁶⁶⁾

Cairan fiksasi yang digunakan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD. Soetomo selama ini adalah larutan formalin *buffer* yang terdiri atas formaldehid

38-40%, air destilata, 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*.

Perubahan kimia pada antigen yang ada di jaringan akibat fiksasi formalin dihilangkan dengan tehnik antigen *retrieval* sehingga antigen dapat terbuka dan mempermudah penetrasi antibodi. Tehnik ini dapat mengembalikan imunoreaktivitas dari antigen jaringan dengan cara *hydrolisis cross-link methylene bridge* yang terbentuk saat fiksasi formalin. Dikenal dengan nama *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 tehnik *PIER* ini adalah enzim dapat merusak epitop antigen dan morfologi jaringan, selain itu metode ini membutuhkan waktu inkubasi dan ketepatan konsentrasi enzim. Kombinasi tehnik *PIER* dan *HIER* dapat digunakan sebagai alternatif bila semua metode *antigen retrieval* gagal mengembalikan imunoreaktivitas antigen. Proses *antigen retrieval* dilakukan selama kurang lebih 20 menit. Proses yang terlalu singkat akan menghasilkan penge-

-catan yang lemah, sedangkan bila terlalu lama akan menyebabkan perubahan warna non spesifik dari latar belakang potongan jaringan. Pada penelitian ini digunakan tehnik *antigen retrieval* metode *HIER* karena relatif lebih singkat, dan tidak merusak antigen dan morfologi jaringan⁽⁶⁶⁾.

Setelah dilakukan fiksasi, perlu dilakukan dehidrasi. Dehidrasi bertujuan membuang air dan menggantinya dengan larutan organik. Dehidrasi dilakukan dengan memasukkan jaringan kedalam alkohol dengan beberapa kosentrasi. 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.⁽⁶⁶⁾

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 blok parafin. Dalam hal ini dapat digunakan tehnik potong beku (*frozen section*) untuk pengecatan imunohistokimia. Pemeriksaan potong beku lebih baik dalam mempertahankan fungsi enzim dan antigen jaringan dibandingkan dengan pembuatan blok parafin. Kerugian dari tehnik potong beku adalah : morfologi jaringan yang kurang baik, resolusi yang buruk pada pembesaran yang tinggi dari mikroskop, dibutuhkan penyimpanan yang khusus, tehnik pemotongan yang lebih sulit dan lebih tebal dengan mikrotom karena kristal es tidak terpotong, dan keterbatasan preparat untuk disimpan lebih lama⁽⁶⁶⁾

Setelah pemotongan jaringan, dilakukan deparafinisasi. Deparafinisasi bertujuan untuk membuang seluruh parafin yang ada pada jaringan. Deparafinisasi yang kurang baik akan menghasilkan pengecatan yang kurang baik.

Terdapat 2 tehnik 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 tehnik 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 tehnik labelisasi enzimatik dan pemberian substrat kromogen, 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*), tehnik ini disebut *indirect immunofluorescent method*. Labelisasi antibodi sekunder juga bisa dilakukan dengan pemberian enzim peroksidase, *alkaline phosphate*, atau *glucose oksidase* sehingga disebut sebagai tehnik *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.⁽⁶⁶⁾

Setelah pengecatan imunohistokimia ini dilakukan inkubasi yang 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.⁽⁶³⁾ Kualitas peroksidase yang kurang baik akan menyebabkan hasil pewarnaan menjadi kurang sempurna. Pemilihan bahan kromogen untuk memberikan perubahan warna harus sesuai dengan label enzim yang dipakai. Pada penelitian ini dipakai enzim *Horseradish peroksidase (HRP)* dan substrat *diaminobenzidine (DAB)*, karena bahan ini memberikan intensitas pewarnaan yang baik dan permanen. Kerugian dari bahan kromogen ini adalah adanya aktivitas peroksidase endogen menyebabkan hasil pewarnaan menjadi *false positive*. Teknik pengecatan imunohistokimia pada penelitian ini menggunakan metode tidak langsung, yang lebih baik dalam mengidentifikasi antigen dibandingkan dengan metode langsung⁽⁶⁶⁾

Banyak sekali faktor-faktor yang dapat menyebabkan hasil pengecatan imunohistokimia menjadi kurang sempurna. Dari pembahasan mengenai proses preparasi jaringan sampai pengecatan, terlihat bahwa untuk mendapatkan hasil pengecatan imunohistokimia yang baik maka diperlukan bahan prepat jaringan yang baik, bahan-bahan pengecatan yang baik, standarisasi kerja, dan tenaga yang terampil dan khusus di bidang ini

BAB 8

KESIMPULAN DAN SARAN

KESIMPULAN

- Ekspresi *VEGF-C* didapatkan pada semua karsinoma sel skuamosa kepala leher yang diteliti dengan ekspresi dan intensitas *immunostaining* yang berbeda-beda sesuai dengan derajat diferensiasinya.
- Terdapat korelasi yang bermakna antara ekspresi *VEGF-C* dengan grading histopatologi pada karsinoma sel skuamosa kepala leher. Semakin jelek derajat diferensiasi sel, makin kuat ekspresi *VEGF-C*.

SARAN

- Diharapkan adanya penelitian prospektif lebih lanjut mengenai *VEGF-C* sebagai salah satu faktor prognostik karsinoma sel skuamosa kepala leher dengan faktor-faktor lain yang mempengaruhi prognostik penderita karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, misalnya dengan terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening leher dan sebagainya.
- Dengan didapatkannya ekspresi *VEGF-C* pada karsinoma sel skuamosa kepala leher, maka diharapkan dapat mendorong penelitian-penelitian lebih lanjut tentang penggunaan inhibitor *VEGF-C* sebagai salah satu modalitas terapi pada keganasan ini.
- Diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang ekspresi *VEGF-C* pada berbagai jenis keganasan lainnya seperti pada keganasan kolorektal, prostat, payudara dan lain-lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saba NF, Khuri FR. Chemoprevention in head and neck cancer. In : Adelstein D, editor. Squamous Cell Head and Neck Cancer. New Jersey: Humana Press; 2005.p.279-303
2. Espat J, Carew JF, Shah JP. Cancer of the head and neck. In: Bland KI, Daly JM, Karakousis CP, editors. Surgical Oncology: contemporary principles & practice. New York: McGraw-Hill; 2001.p.519-44
3. Rhee JC, Khuri F, Skin DM. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. The Oncologist 2004;9:302-311
4. Shin DM, Kim J, Ro JY. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. Cancer Res 1994;54:321-6
5. Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. J clin Oncol 200;10:2046-2052
6. Fortin A, Guerry R, et al. Chromosome 11q13 gene amplifications in oral and oropharyngeal carcinomas: no correlation with subclinical lymphnode invasion and disease recurrence. Clin Cancer Res 1997;3:1909-14
7. Grandis R, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res 1993;53:3579-84
8. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee J, Mao L. Epidermal growth factor receptor correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. J Clin Oncol 2007; 16: 2164-70
9. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. Cancer Res 2000;60:892-5
10. Prince MEP, Ailles LE. Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer. J Clin Oncol 2008;26: 2871-5

11. Buckley JG, Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A. The treatment of distant metastases in head and neck cancer- present and future. *ORL* 2001;63:259-64
12. Seiwert TY, Cohen EEW. Targeted therapies in head and neck cancer. In: Adelstein D, editor. *Squamous cell head and neck cancer*. New Jersey: Humana Press; 2005.p.239-61
13. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001;345: 1890-1900
14. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Dvorak F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med* 2002;196: 1497-1506
15. Homer JJ, Prentice MG, Cawkwell L, Birchall M, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factors A and C in squamous cell carcinoma of the piriform fossa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:1110-4
16. Talbot SG, O-charoenrat P, Sarkaria IS, Ghossein R, Reddy P, Ngai I, Cordeiro CN, Wong RJ, Kris MG, Rusch VW, Singh B. Squamous cell carcinoma related oncogene regulates angiogenesis through vascular endothelial growth factor-A. *Ann Surg Onc* 2004;11:530-4
17. Karpanen T, Alitalo K. Lymphatic vessels as targets of tumor therapy?. *J Exp Med* 2001;6:37-42
18. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *JEM* 2005;201:1089-99
19. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, Fuchihata H. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumor progression and p53 gene status. *J Clin Pathol* 1998;51:771-5
20. Riedel F, Gotte K, Mengfeng L, Hormann K, Grandis JR. Abrogation of VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma decreases angiogenic activity in vitro and in vivo. *Int J Onc* 2003;23:577-83

21. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, Toussaint B, Bresler L, Plenat F. Increased expression of vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endo & Met* 2001;656-8
22. Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. VEGF-C expression correlates with histological differentiation and metastasis in squamous cell carcinoma of esophagus. *Oncology Reports* 2002;9:995-9
23. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JPA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2005;11:1434-40
24. Ahmed MU, Khawar A, Ahmed J, Ajmal M, Bangash WK, Akhter MR. Occult metastasis in carcinoma of oral cavity. *JCPSP* 2007;17:313-5
25. Fakhry V, Gillison ML. Clinical implication of human papillomavirus in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 2006;17:2606-11
26. D' Souza G, Gillison ML. Head and neck squamous cell cancers in the nonsmoker-nondrinker. In: Markman M, editor. *Squamous cell head and neck cancer: recent clinical progress and prospects for the future*. New Jersey : Humana Press; 2005.p.1-26
27. Vokes EE, Weichselbaum R, Lippman SM. Head and Neck Cancer. *New England J Med* 1993; 328: 184-94.
28. Torre JI, Joseph E. Head and neck cancer: squamous cell carcinoma. Last update Jan 2008 . Available on URL: <http://www.emedicine.com>
29. Shah JP. Staging of head and neck cancer. In: Close LG, Larson DL, Shah JP , editors. *Essentials of head and neck oncology*. New York: Thieme; 1998.p. 77-86
30. Greene FL, Oage DL, Flemming ID, Fritz A, Balch CM. *AJCC cancer staging handbook 6th* Springer Verlag ; 2002.p.88-92

31. Werner JA. Patterns of metastasis in head and neck cancer. In: Leong SPL ,editor. Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy. New York: Springer: 2006.p.203-7
32. Watkinson JC, Gaze MN, Wilson JA. Metastatic neck disease. In: Watkinson JC, Gaze MN, Wilson JA , editors. Stell&Maran's Head & neck Surgery 4th ed. Woburn: Butterworth-Heinemann; 2000. p.197-214
33. Vaughan CW. Pathology: Squamous cell carcinoma. Last update August 2004.Available on URL <http://www.emedicine.com/ent/topic671.htm>
34. Werner JA. Patterns of metastasis in head and neck cancer. In: Leong SPL ,editor. Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy. New York: Springer: 2006.p.203-7
35. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endoc Rev 2007;25:581-611
36. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor : basic biology and clinical implications. In: Harmeey JH, editor. VEGF and cancer. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers;2004.p.23-41
37. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. Angiogenesis: basic pathophysiology and implication for disease. Europ Heart J 2003;24:586-603
38. Haiko PI, Karkkainen MJ,Achen MG, Stacker SA, Alitalo K. Growth factors and lymphangiogenesis. In: Napoleone F, editor. Angiogenesis from basic science to clinical application. New York : Taylor&Francis, 2007.p.53-67
39. Herttuala SY, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. Vasciular endothelial growth factors: biology and current status of clinical application in cardiovascular medicine. J Am Coll Cardiol 2007; 10:1015-26
40. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Oosterom AT, De-Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev 2004;56:549-580

41. Ristimaki A. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998; 273:8413-8
42. Detmar M, Hirakawa S. The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J Exp Med* 2002;196: 713-8
43. Dictor M, Mebrahtu S, Selg M, Lokmic Z, Sorokin L. Lymphatic origin from embryonic stem cells. In: Leong SPL, editor. *Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy*. New York: Springer; 2006.p.15-36
44. Jackson DG,. Lymphatic marker, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. In: Leong SPL, editor. *Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy*. New York: Springer; 2006..p.37-49
45. Beasley NJP, Prevo R, Banerji R, Leek RD, Moore J, Cox G . Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research* 2002;62: 1315-20
46. Mandriota S, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Alitalo K. Vascularendothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J* 2001;20:672-82
47. Wilting J, Papoutsi M, Buttler K, Becker J. Embryonic development of the lymphovascular system and tumor lymphangiogenesis. In: Leong SPL, editor. *Cancer metastasis and the lymphovascular system: basis for rational therapy*. New York: Springer; 2006.p.17-23
48. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhanger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wilting J. VEGF and VEGF-C : specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188:96-109
49. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002;16: 922-34
50. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *JCDA* 2007; 73:339-44

51. Tawfik O, Namiq A. Tumors of the mouth, pharynx, nose, and paranasal sinuses. In: Damjanov I, Fan F, editors. *Cancer Grading Manual*. New York: Springer; 2007. p. 6-12.
52. Gangane N, Chawla S, Gupta SS, Sharma SM. Reassessment of risk factors for oral cancer. *Asian Pac J Canc Prev* 2007;8:243-8
53. Gallo O, Franchi A, Magnetti L, Sardi F, Vannaci A, Baddi V. Cox-2 pathway correlation with VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma. Implication for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001;3:53-61
54. Neuchrist C, Quint C, Pammer A, Burian M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinoma of the larynx: an immuno-histochemical study. *Acta Otolaryngol* 1999; 119:732-8
55. Lim SC, Park SY. Correlation of cyclooxygenase-2 pathway and VEGF expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Report* 2003;10:1073-9
56. Ding MX, Lin XQ, Fu XY, Zhang N, Li JC. Expression of vascular endothelial growth factor-C and angiogenesis in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12:4582-5
57. Uehara M, Sano K, Ikeda H, Sekine J, Irie A, Yokota T, Tobita T, Ohba S, Inokuchi T. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:321-5
58. Hiroyuki M, Katsutoshi M, Tetsufumi O, Satoru T, Kiyoshi M, Yoh U. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression correlates with p53 and Ki-67 expressions in tongue squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 2002;22:1039-44
59. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yia-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:819-25
60. Kodama M, Kitadai Y, Tanaka M, Kuwai T, Tanaka S, Oue N, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor-C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. *Clin Cancer Res* 2008;14:7205-14

61. Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Schafer C, Hormann K. Vasvular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck . *Act Otolaringol* 2000;1:105-11
62. Cicco R, Watson J, Bassi D, Litwin S, Klein-Szanto A. Simultaneous expression of furin and vascular endothelial growth factor in human oral tongue squamous cell carcinoma progression. *Clin Canc Research* 2004;10:4480-8
63. Siironen P, Ristimaki A, Narko K, Nordling S, Louhimo J, Andersson S, Haapiainen R, Haglund C. Vegf-C and COX-2 expression in papillary thyroid cancer. *Endoc-Related Canc* 2006;13:465-73
64. Karin J, Christina V, Wang WZ, Jan-Erik D. Expression of vascular endothelial growth factor-C and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *The Prostate* 2005;65: 110-6
65. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Valesco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:192-8
66. Farmilo AJ. Fixation and Processing, In: Key M., editors. *Immunohistochemical Staining Methods*. 4th ed. California: Dako; 2006.p.27-35.

Lampiran 1. Cara pemeriksaan histopatologis dengan pengecatan Hematoksilin Eosin cara Meyer untuk menentukan grading karsinoma sel skuamosa

1. Spesimen hasil operasi segera difiksasi dalam larutan bufer formalin (kurang dari 1 jam) dan segera dikirim ke laboratorium PA.
2. Jaringan dipotong untuk difiksasi dengan ketebalan 0,5-1 cm agar penetrasi fiksatif merata dan sempurna
3. Proses fiksasi
 - Jaringan dimasukkan ke dalam cairan fiksatif minimal 5-10 kali volume jaringan dengan larutan formalin netral bufer 10%, dengan komposisi sebagai berikut:

• Formaldehid 37-40%	100ml
• Aquades	900ml
• Natrium Fosfat Monobasik	4gr
• Natrium Fostat dibasik (Anhidrous)	6,5gr
 - minimal selama 6-36 jam.
 - Kemudian jaringan ditiriskan dengan diletakkan pada kertas merang (tissue) atau dibilas dengan air kran.
4. Proses dehidrasi, *clearing*, dan infiltrasi parafin.
 - pengolahan jaringan yang sudah difiksasi sempurna untuk dibuat blok parafin dilakukan secara manual dengan cara memasukkan jaringan yang telah difiksasi tersebut ke dalam larutan alkohol 70% selama 30 menit, alkohol 70% selama 30 menit, alkohol 80% selama 30 menit, , alkohol 96% selama 30 menit, alkohol 96% selama 30 menit, alkohol 100% selama 30 menit, alkohol 100% selama 30 menit, dan alkohol 100% selama 30 menit.
 - Kemudian dilakukan *clearing* dengan menggunakan *xylo* 1 selama 30 menit dan *xylo* 2 selama 30 menit.
 - Jaringan dimasukkan ke dalam parafin cair kemudian diinkubator/ dimasukkan kedalam oven dengan suhu 55°C-57°C mulai jam 18.00-06.00.
5. Pembuatan blok parafin (*embedded block*)
6. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom 3-5 mikron dan ditempelkan pada gelas objek.

7. Sediaan dicelup dalam larutan *xylol* bak I selama 5 menit
8. Pindahkan dalam larutan *xylol* bak II selama 5 menit dan ke dalam larutan *xylol* bak III, selama 5 menit
9. Masukkan dalam alkohol 96% bak I dan II masing-masing 2 menit, kemudian ke dalam alkohol 80% selama 2 menit
10. Cuci dalam air mengalir selama \pm 10 menit
11. Masukkan dalam larutan meyer hematoksilin selama 15 menit
12. Cuci kembali dengan air mengalir selama 20 menit
13. Dimasukkan bak eosin 1% selama 1 menit
14. Dimasukkan dalam alkohol 80% selama 2 menit kemudian alkohol 90% bak II dan III masing-masing 2 menit
15. Terakhir dimasukkan dalam *xylol* bak I, II, dan III masing-masing 5 menit
16. Ditunggalkan dengan *cover glass*

Lampiran 2. Tehnik Pengecatan Imunohistokimia untuk mendeteksi VEG-C dari Sediaan Blok Parafin

1. Deparafinikasi sediaan:
 - a. Rendam dalam *xylene* sebanyak 3 kali, masing-masing selama 5 menit
 - b. Rendam dalam etanol 100% 2 kali masing-masing selama 10 menit
 - c. Rendam dalam etanol 95% 2 kali masing-masing selama 10 menit
 - d. Rendam dalam etanol 70% 2 kali masing-masing selama 10 menit
2. Cuci sediaan 2 kali dalam air destilata sebanyak 2 kali masing-masing selama 5 menit
3. Cuci sediaan dalam PBS selama 5 menit
4. Lakukan pemanasan sediaan dalam 10mM *buffer* sodium sitrat (pH 6.0) selama 1 menit dengan pemanasan tinggi dan selama 9 menit dengan pemanasan sedang
5. Cuci sediaan dalam air destilata 3 kali masing-masing selama 5 menit
6. Inkubasi sediaan dalam hidrogen peroksida 1% selama 10 menit
7. Cuci sediaan dalam air destilata 3 kali masing-masing selama 5 menit
8. Cuci sediaan dalam PBS selama 5 menit
9. *Blocking slide* dengan 50uL *Swaine serum (NSS)* selama 1 jam pada suhu kamar
10. *Unblocking* dengan 50 uL cairan antibodi primer, inkubasi semalaman pada 4^oC
11. Cuci sediaan dalam PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit
12. Tambahkan 50 uL antibodi sekunder *labeled Polymer-Hrp*, inkubasi selama 30 menit dalam suhu kamar
13. Cuci sediaan dengan PBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit
14. Tambahkan 50 uL reagen DAB ke setiap sediaan, awasi perubahan warna secara ketat
15. Begitu warna menjadi coklat, segera rendam dalam air destilata
16. Dilakukan *counterstain* dengan hematoksilin selama 5 menit
17. Cuci *slide* dalam air destilata sebanyak 2 kali masing-masing 5 menit

18. Dehidrasi *slide* :

- a. Dalam etanol 95% sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 detik
- b. Dalam etanol 100% sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 detik
- c. Dalam *xyfene*, sebanyak 2 kali masing-masing selama 10 detik

19. Dilakukan *mounting* dengan entelan.

20. Ekspresi *VEG-C* tampak sebagai warna merah di daerah sitoplasma sel.

21. Sediaan diinterpretasi oleh seorang senior ahli imunohistokimia

22. Dilakukan pemeriksaan sebanyak 5 lapangan pandang dengan pembesaran 200x dan dihitung secara semi kuantitatif berapa persen jumlah inti sel yang menunjukkan ekspresi *VEGF-C* pada setiap lapangan pandang.

Lampiran 3.

PENELITIAN IMUNOHISTOKIMIA VEGF-C SKUAMOSA SEL KARSINOMA KEPALA LEHER**Dr Fendy Matulatan**

No	DMK	No.PA	No.SLIDE	IMHK	GRADING	TGL	KETERANGAN
1	10831880	T.2510/08	1	25%	WELL	07//2008	+2 Foto
2	615252	T.2286/08	2	5%	WELL	24/4/2008	+1
3	10810654	T.1922/08	3	7%	WELL	07/4/2008	+1
4	10798047	T.1064/08	4	10%	WELL	22/2/2008	+1
5	10767729	T.455/08	5	10%	WELL	24/1/2008	+1 Foto
6	10759663	T.5364/07	6	10%	WELL	13/9/2007	+1
7	10850838	T.480/08	31	10%	WELL	28/8/2008	+1 Foto
8	10830082	T.4109/08	32	5%	WELL	24/7/2008	+1
9	10809205	T.1466/0	33	20%	WELL	13/3/2008	+2 Foto
10	10841939	T.3677/08	18	15%	MODRT	01/7/2008	+2
11	10755889	T.306/08	19	15-20%	MODRT	17/1/2008	+2
12	10734394	T.3808/07	20	20%	MODRT	03/7/2007	+2
13	10633437	T.2992/07	21	20%	MODRT	28/5/2007	+2
14	10687657	T.947/07	22	10-15%	MODRT	28/4/2008	+2
15	10590377	T.2227/06	23	10-15%	MODRT	28/4/2006	+2
16	10608514	T.2748/06	24	10-15%	MODRT	29/5/2006	+2
17	10815025	T.1613/08	34	10%	MODRT	24/3/2008	+2
18	10835104	T.4465/08	7	10-15%	MODRT	13/8/2008	+2
19	10827005	T.2255/08	9	25%	POORLY	23/4/2008	+2
20	10809862	T.1200/08	11	20-25%	POORLY	28/2/2008	+2
21		T.777/08	13	30-40%	POORLY	11/2/2008	+2 Foto
22	10786664	T.689/08	14	25-30%	POORLY	04/2/2008	+2
23	10729460	T.6335/07	15	30-40%	POORLY	8/11/2007	+2 Foto
24	10748595	T.4954/07	16	30%	POORLY	27/8/2007	+2
25	10805058	T.1803/08	17	30%	POORLY	01/4/2008	+2
26	10837962	T.3134/08	25	>50%	UNDIFF	26/6/2008	+3 Foto
27	10844122	T.3604/08	26	25%	UNDIFF	26/6/2008	+2
28	10833506	T.2644/08	27	>50%	UNDIFF	12/5/2008	+3 Foto
29	10836168	T.2827/08	28	5%	UNDIFF	21/5/2008	+1
30	10848648	T.3733/08	29	50%	UNDIFF	03/7/2008	+3
31	10834422	T.3450/08	30	50%	UNDIFF	18/6/2008	+3
32	10860527	T.4872/08	35	50%	UNDIFF	09/1/2008	+3 Foto

Surabaya, 25 November 2008

Kriteria:

0 : neg
+1 : <10%
+2 : >10% - <50%
+3 : <50%

Hormat kami,

Prof.Dr. Juliatl Hood A.,dr.,MS,SpPA(K),FIAC

Lampiran 4. Sampel Penelitian Korelasi Ekspresi VEGF-C dengan Grading Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

No	Nama	Gender	Umur (thn)	No.DMK	No.PA	Diagnosis	Grading	Pemeriksaan Imunohistokimia VEGF-C	
								(%)	SKOR
1	Toya B Toha	Laki-laki	60	10831880	T.2510/08	Ca Bukal	Well Diff.	25	+ 2
2	Purnomo	Laki-laki	68	615252	T.2286/08	Ca Laring	Well Diff.	5	+1
3	Rasimin	Laki-laki	46	10810654	T.1922/08	Ca Lidah	Well Diff.	7	+1
4	Wasisto	Laki-laki	55	10798047	T.1064/08	Ca Lidah	Well Diff.	10	+1
5	Giri Setyo Y	Laki-laki	50	10767729	T.455/08	Ca Laring	Well Diff.	10	+1
6	Rebani	Laki-laki	75	10759663	T.5364/07	Ca Laring	Well Diff.	10	+1
7	Satip	Laki-laki	60	10850838	T.4801/08	Ca Laring	Well Diff.	10	+1
8	Mukni	Laki-laki	44	10830082	T.4109/08	Ca Laring	Well Diff.	5	+1
9	Rupiah, ny	Wanita	37	10809205	T.1466/08	Ca Lidah	Well Diff.	20	+2
10	Sukarman	Laki-laki	55	10841939	T.3677/08	Ca Palatum	Moderately Diff.	15	+2
11	Karsodin	Laki-laki	83	10755889	T.306/08	Ca Laring	Moderately Diff.	15-20	+2
12	Saman, ny	Wanita	72	10734394	T.3808/07	Ca Maksila	Moderately Diff.	20	+2
13	Iskandi	Laki-laki	57	10633437	T.2992/07	Ca Labial	Moderately Diff.	20	+2
14	Moh Kahfi	Laki-laki	54	10687657	T.947/07	Ca Laring	Moderately Diff.	10-15	+2
15	Abdul Maad Ah	Laki-laki	67	10590377	T.2227/06	Ca Sino Nasal	Moderately Diff.	10-15	+2
16	Sukeni	Laki-laki	57	10608514	T.2748/06	Ca Lidah	Moderately Diff.	10-15	+2
17	Suratman	Laki-laki	86	10815025	T.1613/08	Ca Laring	Moderately Diff.	10	+2
18	Yosep Mogo	Laki-laki	37	10835104	T.4465/08	Ca Lidah	Poorly Diff.	10-15	+2
19	Ruminingsih, ny	Wanita	45	10827005	T.2255/08	Ca Sino Nasal	Poorly Diff.	25	+2
20	Moh Moestadi	Laki-laki	52	10809862	T.1200/08	Ca Laring	Poorly Diff.	20-25	+2
21	Sujiman	Laki-laki	35	-	T.777/08	Ca Nasofaring	Poorly Diff.	30-40	+2
22	Suparyati,ny	Wanita	60	10786664	T.689/08	Ca Maksila	Poorly Diff.	25-30	+2
23	Srimulyaningsih,ny	Wanita	42	10729460	T.6335/07	Ca Sino Nasal	Poorly Diff.	30-40	+2
24	Aripah,ny	Wanita	47	10748595	T.4954/07	Ca Maksila	Poorly Diff.	30	+2

Lanjutan Sampel Penelitian Korelasi Ekspresi VEGF-C dengan Grading Histopatologi Karsinoma Sel Skuamosa Kepala dan Leher

No	Nama	Gender	Umur (thn)	No.DMK	No.PA	Diagnosis	Grading	Pemeriksaan Imunohistokimia VEGF-C	
								(%)	SKOR
25	Adris	Laki-laki	64	10805058	T.1803/08	Ca Laring	Poorly Diff.	30	+ 2
26	Masria,ny	Wanita	45	10837962	T.3134/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	>50	+3
27	Rismayanti,ny	Wanita	35	10844122	T.3604/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	25	+1
28	Slamet	Laki-laki	48	10833506	T.2644/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	>50	+3
29	Juma'adin	Laki-laki	36	10836168	T.2827/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	5	+1
30	Jamak	Laki-laki	39	10848648	T.3733/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	50	+2
31	Lintang Nirmala	Wanita	3	10834422	T.3450/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	50	+2
32	Moch Yuro	Laki-laki	60	10860527	T.4872/08	Ca Nasofaring	Undifferentiated.	50	+2

Keterangan:

Ekspresi ini digolongkan menjadi 4 bagian yaitu

- 0 : Bila pengecatan terhadap VEGF-C tidak tampak atau 0% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x.
- 1+ : Bila pengecatan terhadap VEGF-C tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip kurang dari 10% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 2+ : Bila pengecatan terhadap VEGF-C tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip antara 10%-50% dari 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x
- 3+ : Bila pengecatan terhadap VEGF-C tampak (positip), dengan presentase rata-rata area yang positip lebih dari 50% pada 5 lapangan pandang yang dilakukan secara acak dengan pembesaran 200x

Lampiran 5. Hasil Analisis Statistik

SEX

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Laki-laki	23	71.9	71.9	71.9
Perempuan	9	28.1	28.1	100.0
Total	32	100.0	100.0	

PA

	Frequency	Percent	Valid	Cumulative Percent
Valid Ca Laring	10	31.3	31.3	13.3
Ca Nasofaring	8	25.0	25.0	56.3
Ca Lidah	5	15.6	15.6	71.9
Ca Maksila	3	9.4	9.4	81.3
Ca Nasal	3	9.4	9.4	90.7
Ca Bukal	1	3.1	3.1	93.8
Ca Labial	1	3.1	3.1	96.9
Ca Palatum	1	3.1	3.1	100.0
Total	32	100.0	100.0	

Grading

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Well-diff	14	46.7	46.7	46.7
Moderately diff	7	23.3	23.3	70.0
poorly/undiff	9	30.0	30.0	100.0
Total	30	100.0	100.0	

PA * Grading Crosstabulation

			Grading				Total
			Well differentiated	Moderate differentiated	Poorly Differentiated	Undifferentiated	
PA	Ca Laring	Count	5	3	2	0	10
		% within PA	50.0%	30.0%	20.0%	0.0%	100.0%
	Ca Nasofaring	Count	0	0	1	7	8
		% within PA	0.0%	0.0%	12.5%	87.5%	100.0%
	Ca Lidah	Count	3	1	1	0	5
		% within PA	60.0%	20.0%	20.0%	0.0%	100.0%
	Ca Maksila	Count	0	1	2	0	3
		% within PA	0.0%	33.3%	66.6%	0.0%	100.0%
	Ca Nasal	Count	0	1	2	0	3
% within PA		0.0%	33.3%	66.6%	0.0%	100.0%	
Ca Bukal	Count	1	0	0	0	1	
	% within PA	100.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100.0%	
Ca Labial	Count	0	1	0	0	1	
	% within PA	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	
Ca Palatum	Count	0	1	0	0	1	
	% within PA	0.0%	100.0%	0.0%	0.0%	100.0%	
Total	Count	9	8	8	7	32	
	% within PA	28.1%	25.0%	25.0%	21.9%	100.0%	

SEX * Grading Crosstabulation

			Grading				Total
			Well differentiated	Moderately differentiated	Poorly differentiated	Undifferentiated	
SEX	Laki-laki	Count	8	7	4	4	23
		% within SEX	34.8%	30.4%	17.4%	17.4%	100.0%
	Perempuan	Count	1	1	4	3	9
		% within SEX	11.1%	11.1%	44.4%	33.3%	100.0%
Total	Count	9	8	8	7	32	
	% within SEX	28.1%	25.0%	25.0%	21.9%	100.0%	

Statistics

		Kelamin	Recodeumur	Diagnosis	Grading Hlstopatologis	Skor
N	Valid	32	32	32	32	32
	Missing	0	0	0	0	0
	Mean	1.28	5.7188	4.56	2.41	1.84
	Median	1.00	6.0000	3.50	2.00	2.00
	Std. Deviation	.457	1.57058	2.577	1.132	.574
	Minimum	1	1.00	1	1	1
	Maximum	2	8.00	8	4	3

Frequency Table

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Laki-Laki	23	71.9	71.9	71.9
	Perempuan	9	28.1	28.1	100.0
Total		32	100.0	100.0	

Recodeumur

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0-9	1	3.1	3.1	3.1
30-39	6	18.8	18.8	21.9
40-49	7	21.9	21.9	43.8
50-59	7	21.9	21.9	65.6
60-69	7	21.9	21.9	87.5
>70	4	12.5	12.5	100.0
Total	32	100.0	100.0	

Diagnosis

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Ca Bukal	1	3.1	3.1	3.1
Ca Laring	10	31.3	31.3	34.4
Ca lidah	5	15.6	15.6	50.0
Ca Palatum	1	3.1	3.1	53.1
Ca maksila	3	9.4	9.4	62.5
Ca labial	1	3.1	3.1	65.6
Ca Nasal	3	9.4	9.4	75.0
Ca nasofaring	8	25.0	25.0	100.0
Total	32	100.0	100.0	

Grading Histopatologis

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid Well Diff	9	28.1	28.1	28.1
Moderately Diff	8	25.0	25.0	53.1
Poorly Diff	8	25.0	25.0	78.1
Undiff	7	21.9	21.9	100.0
Total	32	100.0	100.0	

Skor

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 1	8	25.0	25.0	25.0
2	21	65.6	65.6	90.6
3	3	9.4	9.4	100.0
Total	32	100.0	100.0	

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Umur	32	3	86	52.31	16.257
Valid N (listwise)	32				

VEGF-C Polyclonal Antibody

CATALOG #: 5633-100
AMOUNT: 100 µg
LOT #: _____
HOST: Goat
IMMUNOGEN: Recombinant human VEGF-C

FORMULATION:

100 µg (0.5 mg/ml) antigen affinity purified goat polyclonal antibody in phosphate-buffered saline (PBS) containing 50% glycerol, 1% BSA, and 0.02% thimerosal.

SPECIES REACTIVITY: human

STORAGE CONDITIONS:

Store at -20°C. For long term storage, aliquot and freeze at -70°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

SPECIFICITY:

The antibody recognizes human VEGF-C. Reactivity to other species has not been tested.

APPLICATION:

The antibody can be used in Western blotting (0.5-1 µg/ml) and immunohistochemistry with both frozen and paraffin sections (15-25 µg/ml). However, the optimal concentrations should be determined individually.

USAGE: For Research Use Only. Not to be used in human.

RELATED PRODUCTS:

Apoptosis Detection Kits & Reagents

- Caspase Assay Kits & Reagents
- Mitochondrial Apoptosis Kits & Reagents
- Nuclear Apoptosis Kits & Reagents
- Apoptosis Inducers and Set
- Apoptosis siRNA Vectors

Cell Fractionation System

- Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit
- Nuclear/Cytosol Fractionation Kit
- Membrane Protein Extraction Kit
- Cytosol/Particulate Rapid Separation Kit
- Mammalian Cell Extraction Kit
- FractionPREP Fractionation System

Cell Proliferation & Senescence

- Quick Cell Proliferation Assay Kit
- Senescence Detection Kit
- High Throughput Apoptosis/Cell Viability Assay Kits
- LDH-Cytotoxicity Assay Kit
- Bioluminescence Cytotoxicity Assay Kit
- Live/Dead Cell Staining Kit

Cell Damage & Repair

- HDAC Fluorometric & Colorimetric Assays & Drug Discovery Kits
- HAT Colorimetric Assay Kit & Reagents
- DNA Damage Quantification Kit
- Glutathione & Nitric Oxide Fluorometric & Colorimetric Assay Kits

Signal Transduction

- cAMP & cGMP Assay Kits
- Akt & JNK Activity Assay Kits
- Beta-Secretase Activity Assay Kit

Adipocyte & Lipid Transfer

- Recombinant Adiponectin, Survivin, & Leptin
- CETP Activity Assay & Drug Discovery Kits
- PLTP Activity Assay & Drug Discovery Kits
- Total Cholesterol Quantification Kit

Molecular Biology & Reporter Assays

- siRNA Vectors
- Cloning Insert Quick Screening Kit
- Mitochondrial & Genomic DNA Isolation Kits
- 5 Minutes DNA Ligation Kit
- 20 Minutes Gel Staining/Destaining Kit
- β-Galactosidase Staining Kit & Luciferase Reporter Assay Kit

Growth Factors and Cytokines

Monoclonal and Polyclonal Antibodies

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA