

TESIS

**PERBEDAAN JUMLAH SEL PENGEKSPRESI CD95 DAN APOPTOSIS
PADA KANKER PAYUDARA TIPE MEDULLARY DAN NON
MEDULLARY**



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

LUH ADE WILAN KRISNA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**PERBEDAAN JUMLAH SEL PENGEKSPRESI CD95 DAN APOPTOSIS
PADA KANKER PAYUDARA TIPE *MEDULLARY* DAN *NON
MEDULLARY***

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister Dalam Program Studi Ilmu
Kedokteran Dasar Pada Program Pascasarjana
Universitas Airlangga**

Oleh :

LUH ADE WILAN KRISNA

090810508

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis dengan judul '*Perbedaan Jumlah Sel Pengekspresi CD95 dan Apoptosis pada Kanker Payudara Tipe Medullary dan Non Medullary*' telah disetujui pada tanggal 17 Juni 2010.

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua** : Prof. Dr. Paulus Liben, dr, MS
- Anggota** : 1. Dr. I Ketut Suidiana, MS
2. dr. Troef Soemarno, MS, SpPA(K)
3. Prof. dr. Retno Handajani,MS, Ph.D
4. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes
5. dr. Tulus Panuwun, MS, SpPA(K)

UCAPAN TERIMA KASIH

Mengawali penulisan tesis ini, penulis memanjatkan puji syukur ke hadirat Ida Sang Hyang Widhi Wasa atas waranugrahaNya sehingga dapat menyelesaikan penelitian dan seluruh kegiatan akademis di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Selama menjalani pendidikan, sungguh banyak bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, untuk semua itu perkenankanlah penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan setulus hati kepada :

1. Dr. I Ketut Sudiana, MS atas kesediaan menjadi pembimbing ketua, terima kasih telah meluangkan waktu untuk diskusi, dengan tulus memberikan bimbingan dan arahan sehingga penulis dapat menyelesaikan dan menyempurnakan tesis ini.
2. dr. Troef Soemarno, MS, SpPA(K) selaku pembimbing kedua dan Ketua Minat Studi Patobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga untuk bimbingan dan petunjuk saran yang sangat membantu dalam setiap permasalahan yang penulis hadapi selama menjalani pendidikan dan dalam proses penyelesaian tesis.
3. Prof. Dr. Paulus Liben, dr, MS, dr. Tulus Panuwun, MS, SpPA(K) selaku panitia penguji atas masukan dan saran perbaikan yang diberikan sampai terselesainya tesis ini.
4. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr, M.Kes sebagai konsultan atas bantuan pemikiran dan bimbingannya untuk analisis statistik.
5. Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt, selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya.

6. Prof. Dr. Muhammad Amin, dr, SpP(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
7. Prof. Dr. Harjanto JM. Dr, AIF, selaku Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
8. Prof. Dr. Retno Handajani, MS, Ph.D selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan asuhan akademik beserta seluruh staf dan karyawan yang telah memberikan bantuan, kesempatan, dan fasilitas kepada penulis selama pendidikan.
9. Seluruh staf pengajar Patobiologi Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, untuk ilmu pengetahuan dan pencerahan yang tak ternilai harganya, yang diperoleh penulis selama pendidikan.
10. Direktur RS. Onkologi Surabaya, Estiningtyas Nugraheni, SKM, MARS yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Pascasarjana di Universitas Airlangga.
11. Staf medik RS. Onkologi Surabaya, dr. Ario Djatmiko, SpB, FICS, dr. Wiwien Ristanto, SpB atas semua fasilitas dan peranan yang diberikan selama penulis menjalani pendidikan.
12. dr. Sindrawati, SpPA(K), tiada kata dapat mengungkapkan rasa terima kasih penulis untuk bimbingan dan dukungan moral yang diberikan mulai dari awal sampai berakhirnya penulisan tesis ini.
13. Staf laboratorium Patologi Anatomi RS. Onkologi Surabaya, Bapak Eko Mulyo Husodo, SKM, Dwi Suryani, Noor Aisyah, S.Si yang dengan sabar telah membantu penulis mulai dari pengumpulan sampel, proses pengerjaan di

- laboratorium, hingga penelitian ini selesai.
14. Penulis mempersembahkan karya tulis ini disertai ucapan terima kasih dan rasa hormat serta penghargaan kepada kedua orang tua, Ayahanda I Nyoman Djawi dan Ibunda Ni Nyoman Suryati atas kasih sayang, doa, dukungan, semangat, dan kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk mengenyam pendidikan setinggi – tingginya demi meraih cita. Untuk jasa – jasa beliau, semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa memberikan umur panjang, kesehatan, rejeki berlimpah, dan kedamaian.
 15. dr. Luh Gede Djatu Anggitadewi, kakak tersayang yang telah memberikan dukungan doa dan semangat sehingga penulis selalu termotivasi untuk bertahan dari berbagai cobaan dan dapat menyelesaikan pendidikan. Semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa selalu melimpahkan kasih sayang dan selalu berada dalam lindungannya.
 16. dr. Komang Agung Irianto, SpOT untuk saran, masukan, dan dukungan semangat pada setiap kesempatan guna mempecepat penyelesaian tesis ini.
 17. Setulus hati penulis mengucapkan terima kasih untuk dukungan dan kebersamaan yang tak lekang oleh waktu dari sahabat - sahabat Biologi ITS angkatan 2000, Angga Ardiansyah, S.Si, Faisol, S.Si, Misbahul Munir, S.Si, Nurul Jadid, S.Si. M.Sc, Novalia Rachmawati, S.Si, M.Sc, Primirahmayani, S.Si, Sofyan Mashudi, S.Si, ,Tanti Utami Dewi, S.Si, M.Sc.
 18. Kepada rekan – rekan Program Pascasarjana Universitas Airlangga angkatan 2008/2009, khususnya rekan minat studi Patobiologi, dr. Titiek Sunaryati, dr. Nindya Shinta, drg. Nenny Prasetyoningrum, Wahyudi Widada S.Kep atas bantuan dan kerjasama selama perkuliahan sampai terselesainya pendidikan.

19. dr. I Made Yoga Adhiyajna, SpOG, M.Kes untuk pelajaran tentang hidup dan kehidupan yang sangat berharga bagi penulis selama menjalani pendidikan.

Semua pihak, rekan sejawat, dan handai taulan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, atas bantuan dan dukungannya, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih. Semoga Tuhan melimpahkan waranugrahaNya bagi kita semua.

Surabaya, 17 Juni 2010

RINGKASAN**PERBEDAAN JUMLAH SEL PENGEKSPRESI CD95 DAN APOPTOSIS
PADA KANKER PAYUDARA TIPE *MEDULLARY* DAN *NON
MEDULLARY***

Luh Ade Wilan Krisna

Kanker payudara tipe *medullary* merupakan salah satu tipe kanker dengan prognosis paling baik. Prognosis baik dari kanker payudara tipe *medullary* bila dibandingkan dengan tipe infiltrating duktal karsinoma lain yang dalam penelitian ini dikategorikan sebagai tipe *non medullary*, diduga berkaitan dengan mekanisme imunitas seluler tubuh terhadap pengendalian kanker.

Kanker payudara tipe *medullary* dicirikan dengan infiltrasi limfoplasmasitik yang dominan bila dibandingkan dengan tipe *non medullary* dikaitkan dengan prognosis baik, diperkirakan bahwa limfosit sebagai unit dasar terbentuknya respon imun mampu berdiferensiasi dan berperan dalam pengenalan sekaligus bereaksi dengan antigen. Infiltrasi limfoplasmasitik yang dominan pada kanker payudara tipe *medullary* diduga dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis melalui aktivasi CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*). Apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dapat terjadi melalui beberapa jalur apoptosis. Dalam penelitian ini, apoptosis diduga melalui jalur interaksi ikatan Fas (CD95) dengan reseptor Fas ligan (FasL/CD95L) karena aktivasi CTL dan sel NK (*Natural Killer Cell*).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 dan jumlah sel yang mengalami apoptosis serta terdapat hubungan antara keduanya pada kanker payudara tipe *medullary*

dibandingkan dengan tipe *non medullary*. Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional* dengan cara pendekatan, observasi atau pengumpulan data sekaligus pada suatu saat (*point time approach*). Subyek penelitian adalah penderita kanker payudara, dan sebagai obyek penelitian adalah sel jaringan kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*. Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan CD95, dan pemeriksaan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*) Assay untuk mengetahui jumlah sel yang mengalami apoptosis.

Analisis statistik menunjukkan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih tinggi signifikan daripada tipe *non medullary* dengan nilai p (0,045). Rerata persentase jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak sebesar $57,00\% \pm 24,30\%$, bila dibandingkan persentase jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary* yaitu $42,00\% \pm 21,42\%$. Hasil uji beda jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* menunjukkan nilai p (0,028) lebih tinggi signifikan daripada tipe *non medullary*. Berdasarkan analisis deskriptif didapat bahwa rerata jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak sebesar $60,50\% \pm 27,23\%$, bila dibandingkan jumlah sel apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary* yaitu $41,50\% \pm 25,39\%$. Berdasarkan uji statistik *Pearson correlation*, korelasi antara variabel jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* menunjukkan derajat hubungan yang tinggi, yaitu sebesar 0,877. Nilai korelasi jumlah sel yang mengalami apoptosis

dengan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*, yaitu 0,816. Dapat disimpulkan bahwa jumlah sel pengeksresi CD95 dan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak dari pada kanker payudara tipe *non medullary*. Dan terdapat hubungan antara sel pengeksresi CD95 dengan sel yang mengalami apoptosis baik pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary* dimana kenaikan jumlah sel pengeksresi CD95 diikuti oleh kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis.

SUMMARY

Differences in Number of CD95 Expression and Apoptosis in Medullary and Non Medullary Type Carcinoma of the Breast

Luh Ade Wilan Krisna

Medullary carcinoma of the breast is one type of cancer with the best prognosis. Best prognosis of this type when compared with the other type of infiltrating ductal carcinoma, which is in this study were categorized as non medullary type may be related to cellular immunity mechanisms controlling the body against cancer.

Medullary carcinoma of the breast characterized by the prominent lymphoid infiltrate when compared with non medullary type was associated with good prognosis, it is estimated that the lymphocyte as the basic unit of the formation of an immune response capable of differentiating as well as react with antigen. Prominent lymphoid infiltrate in medullary carcinoma of the breast can increase the number of cells undergo apoptosis via activation of CTL (cytotoxic T lymphocytes). Apoptosis medullary carcinoma of the breast can occur through several apoptosis channels. In this study, apoptosis allegedly bonding interactions through Fas (CD95) and Fas ligand receptor (FasL/CD95L) due to activation of CTL and NK cells (Natural Killer Cell).

This study aims to prove that there are differences in the number of CD95 expression and apoptosis and there is a relationship between the two types of breast carcinoma. This study was a cross sectional approach, observation or data collection as well as at the same point (time point approach). Subjects were breast cancer patients, and as the research object is the breast carcinoma tissue of medullary and non medullary type. Immunohistochemical examination was performed to determine the number of cells that express CD95, and examination

of TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*) Assay to determine the number of cells that underwent apoptosis.

Statistical analysis showed the number of CD95 expression in medullary carcinoma of the breast significantly higher than non medullary type with p (0.045). The mean percentage of CD95 expression in medullary carcinoma of the breast was higher $57.00\% \pm 24.30\%$, compared to the number of cells in the CD95 expression in non medullary type was $42.00\% \pm 21.42\%$. T test results that the number of cells underwent apoptosis on medullary carcinoma of the breast shows p value (0.028) significantly higher than non medullary type. Based on the descriptive analysis shows that the percentage average number of cells undergo apoptosis in the medullary carcinoma of the breast was $60.50\% \pm 27.23\%$, compared to the number of apoptotic cells in non medullary type is $41.50\% \pm 25.39\%$. Based on statistical *Pearson correlation*, the correlation between the variable number of cells that undergo apoptosis with CD95 expression in medullary carcinoma of the breast showed a high degree relationship, that is equal to 0.877. Correlation value on the number of cells undergo apoptosis with CD95 expression of non medullary breast cancer types, namely 0.816. It can be concluded that the number of CD95 expression and apoptosis in medullary carcinoma of the breast were significantly higher than the type of non medullary breast carcinoma. And there was a relationship between cell CD95 expression with apoptosis in both of breast carcinoma type where the increase in the number of CD95 expression was followed by an increase in the number of cells undergo apoptosis.

Abstract**DIFFERENCES IN NUMBER OF CD95 EXPRESSION AND APOPTOSIS
IN MEDULLARY AND NON MEDULLARY TYPE
CARCINOMA OF THE BREAST**

Luh Ade Wilan Krisna

Medullary carcinoma of the breast is one type of cancer with the best prognosis. An unique subtype of infiltrating ductal carcinoma that is characterized by a prominent lymphoid infiltrate. Activated cytotoxic T lymphocyte (CTL) infiltrating tumor cell nests constitute a major subset within the lymphoid infiltrate. As CTL destroy target tumor cells by triggering apoptosis, it would be of interest to determine whether the apoptotic rate in medullary carcinoma of the breast is increased. This study evaluates the extent of apoptosis in relation to Fas(CD95/APO-1)/Fas Ligand (FasL) expression in medullary carcinoma of the breast. Aims to prove that there are differences in the number of CD95 expression and apoptosis and there is a relationship between the two types of breast carcinoma. As a cross sectional approach, observation or data collection as well as at the same point (time point approach). Twenty cases of medullary carcinoma and twenty cases of poorly differentiated infiltrating ductal carcinoma (non medullary carcinoma) were evaluated. The number of apoptosis was assessed by the TUNEL assay on paraffin-embedded tissue. The number of CD95 expression was determined by immunohistochemistry. The percentage of apoptosis was significantly increased in medullary carcinoma of the breast as opposed to the non medullary type ($60.50\% \pm 27.23\%$ and $41.50\% \pm 25.39\%$, respectively; $p < 0.05$). Increased apoptosis was accompanied by increased the number of CD95 expression ($57.00\% \pm 24.30\%$ and $42.00\% \pm 21.42\%$, respectively; $p < 0.05$). The observation that the majority of medullary carcinoma of the breast express CD95 suggests that increased apoptosis in medullary carcinoma of the breast is mediated by CD95/CD95L.

Keywords : breast carcinoma, apoptosis, CD95

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Dalam	i
Prasyarat Gelar	ii
Lembar Pengesahan	iii
Penetapan Panitia Penguji Tesis	iv
Ringkasan	v
Summary	xii
Abstract	xiv
Daftar Isi	xv
Daftar Gambar	xviii
Daftar Lampiran	xix
Daftar Singkatan	xx
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Anatomi dan Fisiologi Payudara	6
2.2 Patobiologi Molekular Patogenesis	8
2.3 Karsinoma Payudara Tipe <i>Medullary</i>	12
2.4 Karsinoma Payudara Tipe <i>Non Medullary</i>	13
2.5 Biologi Molekular Karsinoma Payudara	14
2.6 Respon Imun Karsinoma Payudara Tipe <i>Medullary</i>	17
2.6.1 Respon imun seluler	20
2.6.2 Respon imun humoral	23
2.7 Mekanisme Kematian Sel	25
2.7.1 Nekrosis	25
2.7.2 Onkosis	25

2.7.3	Apoptosis	26
2.7.3.1	Peranan apoptosis	33
2.7.3.2	Induksi apoptosis oleh CD95	33
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konseptual	34
3.2	Hipotesis Penelitian	35
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN		
4.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	36
4.2	Rancangan Penelitian	37
4.3	Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel	37
4.3.1	Populasi	36
4.3.2	Besar sampel	37
4.3.3	Teknik pengambilan sampel	37
4.4	Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	39
4.4.1	Variabel penelitian	39
4.4.2	Definisi operasional	39
4.5	Lokasi dan Waktu Penelitian	41
4.6	Kerangka Operasional	42
4.7	Rancangan Analisis Data	42
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN		
5.1	Data Penelitian	43
5.2	Analisis Data dan Hasil Penelitian	48
5.2.1	Hasil uji normalitas	48
5.2.2	Hasil uji homogenitas	49
5.2.3	Hasil uji beda variabel jumlah sel apoptosis	49
5.2.4	Hasil uji beda variabel jumlah sel pengeksresi CD95	50
5.2.5	Hasil uji korelasi apoptosis dan sel pengeksresi CD95	50
5.2.6	Hasil uji korelasi kanker payudara	51

BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Metode Penelitian	52
6.1.1	Unit Eksperimen	53
6.1.2	Variabel Penelitian	56
6.1.3	Analisis data statistik	56
6.2	Pembahasan Hasil Penelitian	57
6.2.1	Uji normalitas	57
6.2.2	Uji homogenitas	57
6.2.3	Uji beda	58
BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	69
7.2	Saran	69
	Daftar Pustaka	70

DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	34
Gambar 4.2	Rancangan Penelitian	37
Gambar 4.3	Kerangka Operasional Penelitian	42
Gambar 5.1	Gambaran Histopatologi Kanker Payudara Tipe <i>Medullary</i>	43
Gambar 5.2	Gambaran Histopatologi Tipe <i>Non Medullary</i>	43
Gambar 5.3	Gambaran Sel Apoptosis Kanker Payudara Tipe <i>Medullary</i>	44
Gambar 5.4	Gambaran Sel Apoptosis Tipe <i>Non Medullary</i>	45
Gambar 5.5	Gambaran Ekspresi CD95 Tipe <i>Medullary</i>	46
Gambar 5.6	Gambaran Ekspresi CD95 Tipe <i>Non Medullary</i>	46
Gambar 5.7	Diagram batang jumlah sel apoptosis tipe <i>medullary</i>	48
Gambar 5.8	Diagram batang jumlah sel apoptosis tipe <i>non medullary</i>	48
Gambar 5.9	Diagram batang jumlah sel ekspresi CD95 <i>medullary</i>	49
Gambar 5.10	Diagram batang jumlah sel ekspresi CD95 <i>non medullary</i>	49
Gambar 6.1	Jalur Sinyal Apoptosis melalui CD95	64
Gambar 6.2	Mekanisme Induksi Estrogen dalam Jalur Apoptosis	67

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku data pada kanker payudara	47
Tabel 5.2 Tabel uji korelasi Apoptosis – CD 95 <i>Medullary</i>	53
Tabel 5.3 Tabel uji korelasi Apoptosis – CD 95 <i>Non Medullary</i>	53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Prosedur Pengecatan Imunohistokimia	74
Lampiran 2	Prosedur Pengecatan Apoptosis	77
Lampiran 3	Prosedur Pengecatan Hematoksin Eosin	82
Lampiran 4	Uji Normalitas Data Apoptosis – CD95 <i>Medullary</i>	84
Lampiran 5	Uji Normalitas Data Apoptosis – CD95 <i>Non Medullary</i>	85
Lampiran 6	Uji Komparasi Data Apoptosis	86
Lampiran 7	Uji Komparasi Data CD95	87
Lampiran 8	Uji Korelasi Apoptosis – CD95 <i>Medullary</i>	88
Lampiran 9	Uji Korelasi Apoptosis – CD95 <i>Non Medullary</i>	89
Lampiran 10	Uji Korelasi Apoptosis – CD95 <i>Medullary-Non Medullary</i>	90
Lampiran 11	Uji Komparasi Apoptosis Pengamat 1 - Pengamat 2	91
Lampiran 12	Uji Komparasi CD 95 Pengamat 1 – Pengamat 2	92
Lampiran 13	Data Pengamatan Apoptosis <i>Medullary</i>	93
Lampiran 14	Data Pengamatan Apoptosis <i>Non Medullary</i>	94
Lampiran 15	Data Pengamatan Jumlah Sel CD95 <i>Medullary</i>	96
Lampiran 16	Data Pengamatan Jumlah Sel CD95 <i>Non Medullary</i>	97
Lampiran 17	Surat Etik Penelitian	98
Lampiran 18	Surat Ijin Penelitian	99
Lampiran 19	<i>Data Sheet</i> Antibodi CD95	100

DAFTAR SINGKATAN

ADCC	: <i>Antibody Dependent Cell Cytotoxicity</i>
AI	: <i>Apoptotic Index</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
AP-1	: <i>Activator Protein-1</i>
ATP	: <i>Adenosine Tri Phosphate</i>
Apaf-1	: <i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
Caspase	: <i>Cystein Dependent Aspartate Directed Protease</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
CDK	: <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CD	: <i>Cluster of Differentiation</i>
CTL	: <i>Cytotoxic T lymphocyte</i>
DAB	: <i>Diaminobenzene</i>
DED	: <i>Death Effector Domain</i>
DISC	: <i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ER	: <i>Estrogen Receptor</i>
ERE	: <i>Estrogen Responsive Element</i>
FADD	: <i>Fas Associated Protein Death Domain</i>
GADD	: <i>Growth Arrestand DNA Damage</i>
HLA	: <i>Human Leucocyte Antigen</i>
HE	: <i>Hematoksilin Eosin</i>
HRP	: <i>Horse Peroxidase</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
LAK	: <i>Lymphokine Activated Killer</i>
MAF	: <i>Macrophages Activating Factor</i>
MFF	: <i>Macrophage Fusion Factor</i>
MHC	: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
PR	: <i>Progesterone Receptor</i>

ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SADS	: <i>Small Accelerator for Death Signaling</i>
SFRP	: <i>Secreted Frizzled – Related Protein</i>
SMAF	: <i>Specific Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
Sp-1	: <i>Specificity Protein-1</i>
TAA	: <i>Tumor Associated Antigen</i>
TAM	: <i>Tumor Associated Macrophages</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Th	: <i>Lymphocyte T Helper</i>
Tc	: <i>Lymphocyte T Cytotoxic</i>
Ts	: <i>Lymphocyte T Suppressor</i>
TUNEL	: <i>Terminal deoxyuridine transferase Nukleotide End Labeling</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker payudara merupakan salah satu jenis penyakit ganas yang tidak menular. Penyakit kanker payudara menempati peringkat kedua diantara penyakit keganasan penyebab kematian di negara berkembang pada tahun 2004 berdasarkan data Organisasi Kesehatan Dunia /WHO (Harianto, 2005). *The American Cancer Society* memperkirakan pada tahun 2007 sebanyak 1.3 juta wanita di seluruh dunia didiagnosis menderita kanker payudara, diperkirakan 211.240 wanita di Amerika Serikat didiagnosis menderita kanker payudara stadium I – IV dan sebanyak 40.140 wanita diantaranya meninggal. Kurang lebih 3% kasus kematian wanita di Amerika Serikat disebabkan oleh penyakit ini. Di Kanada, pada tahun 2005, berdasarkan *Canadian Cancer Society*, penderita kanker payudara mencapai 21.600 wanita dan 5.300 diantaranya meninggal. Sementara itu, *Australian Institute of Health and Welfare* melaporkan bahwa satu dari 11 wanita di Australia menderita kanker payudara sebelum usia 75 tahun. Pada tahun 2001 di Australia, 11.791 wanita menderita kanker payudara dan 2.594 diantaranya meninggal karena penyakit tersebut. (Depkes RI, 2005).

Diantara lebih dari 500 ribu kasus kanker payudara per tahun di seluruh dunia, tipe *medullary* merupakan salah satu tipe dengan prognosis paling baik, dengan hampir 84% penderita kanker payudara tipe *medullary* mampu bertahan hidup hingga

10 tahun. Prognosis paling baik dari tipe kanker payudara ini bila dibandingkan dengan tipe infiltrating duktal karsinoma lain yang dalam penelitian ini dikategorikan sebagai tipe *non medullary*, diduga berkaitan dengan mekanisme imunitas seluler tubuh terhadap pengendalian kanker, yang sampai saat ini masih belum jelas. Mekanisme imunitas seluler tubuh terhadap pengendalian kanker apabila belum diketahui dengan pasti, maka prediksi pengembangan terapi untuk kanker akan terhambat. (National Institute Data, 2007).

Pada kebanyakan penyakit kanker, respon imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel imunokompeten, termasuk mediator yang dihasilkan. Kanker payudara tipe *medullary* dicirikan dengan infiltrasi limfoplasmasitik yang dominan bila dibandingkan dengan tipe *non medullary* dikaitkan dengan prognosis baik, diperkirakan bahwa limfosit sebagai unit dasar terbentuknya respon imun mampu berdiferensiasi dan berperan dalam pengenalan sekaligus bereaksi dengan antigen. (Abbas, 2008).

Sel kanker muncul sebagai akibat dari adanya mutasi. Permukaan sel kanker akan mengekspresikan suatu protein asing yang dapat memicu respon imun baik respon imun humoral maupun respon imun seluler. Respon imun humoral tampaknya kurang mampu mengeksekusi sel kanker karena sel tersebut mempunyai kemampuan untuk menyembunyikan epitop dari permukaan sel, sehingga tidak dapat dikenali oleh antibodi. Respon imun seluler lebih protektif dalam penanggulangan sel kanker dimana antigen berupa sel kanker akan ditangkap oleh makrofag yang kemudian akan dipresentasikan ke permukaan sel oleh *Antigen Presenting Cell (APC)*. Sel kanker

yang yang ditangkap oleh APC tergolong antigen yang bersifat eksogenus, sehingga APC akan mempresentasikan antigen ke permukaannya bersama dengan *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kelas II. MHC kelas II yang berada di permukaan APC akan dikenali oleh *lymhocyte T helper* (Th). Selanjutnya APC mensekresi sitokin, yaitu *Interleukin-1* (IL-1) dan *Interleukin-12* (IL-12). Kedua sitokin ini akan menginduksi Th sehingga mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2. Sitokin IL-1 yang dihasilkan oleh APC akan menginduksi Th1 untuk menjadi lebih aktif dan melepaskan sitokin *Interferon gamma* (IFN γ), *Transforming Growth Factor beta* (TGF β) dan *Interleukin-2* (IL-2). IFN γ dan TGF β berperan dalam memicu aktivitas APC agar lebih aktif menangkap antigen yang masuk ke dalam tubuh. Di sisi lain, IL-2 dan IFN γ yang dihasilkan oleh Th1 juga berperan untuk menginduksi Th2 sehingga Th2 mampu mensekresi sitokin IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10. IL-4, IL-5, dan IL-6 akan menginduksi limfosit B menjadi sel plasma yang mampu mensekresi antibodi (imunoglobulin) dan sel memori. IL-2 dan IFN γ yang dihasilkan oleh Th1 juga berperan memicu aktivitas sel *Natural Killer cell* (NK), dimana sel NK yang aktif akan sangat berperan dalam membunuh sel kanker melalui jalur *Fas Associated Protein Death Domain* (FADD) yang diaktivasi oleh ikatan ligan di permukaan sel NK dengan fas di permukaan sel kanker. Jika antigen berupa sel kanker yang ditangkap APC bersifat endogenus, APC akan mempresentasikan antigen ke permukaan selnya bersama MHC kelas I. MHC kelas I kemudian akan dikenali oleh *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL). CTL yang teraktivasi juga sangat berperan dalam penghancuran sel kanker melalui jalur FADD, seperti yang dilakukan sel NK. Oleh karena itu, CTL dan sel NK disebut juga sel

pengekspresi CD95 karena kemampuannya untuk mengekspresikan ligan pada permukaannya, yang akan berikatan dengan reseptor fas di permukaan sel kanker untuk memicu terjadinya apoptosis. Infiltrasi limfoplasmasitik yang dominan pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan pada tipe *non medullary* diduga dapat meningkatkan jumlah sel yang mengalami apoptosis. Dengan pemahaman tentang perbedaan jumlah sel pengekspresi CD95 dan sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary* diharapkan dapat dijadikan sebagai dasar pengembangan terapi lanjutan, yang nantinya akan meningkatkan angka *survival rate* bagi penderita kanker payudara. (Sudiana, 2008).

1.2 Rumusan Masalah

- a. Apakah jumlah sel pengekspresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel pengekspresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*?
- b. Apakah jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*?
- c. Apakah ada hubungan antara sel pengekspresi CD95 dan sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan sel pengeksresi CD95 dan apoptosis berperan dalam respon imun seluler kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan dengan tipe *non medullary*.
2. Untuk membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan dengan tipe *non medullary*.
3. Untuk membuktikan bahwa terdapat hubungan antara sel pengeksresi CD95 dan sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Teoritis :

Memberi informasi ilmiah tentang sel pengeksresi CD95 dan apoptosis pada respon imun seluler kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

1.4.2 Praktis :

Sebagai dasar pengembangan prediktor dalam penentuan prognosis kanker payudara.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi dan Fisiologi Payudara

Payudara wanita dewasa, secara vertikal terletak pada kostal kedua sampai keenam dan secara horizontal terletak diantara tepi tulang sternum dan garis *mid-axilla*. Diameter payudara sebesar antara 10 – 12 cm dengan ketebalan 5- 7 cm pada bagian yang tertinggi. Bagian terbesar payudara sebanyak 2/3 bagian terletak di atas muskulus pektoralis mayor dan 1/3 bagian terletak di atas muskulus anterior. Payudara berbentuk hemisferis dengan bagian lateral atas meluas ke aksila (*axillary tail of Spence*) masuk ke fascia aksila yang terbuka (*foramen of Langer*). Payudara terdiri dari 3 struktur utama yaitu : kulit, jaringan subkutis, dan jaringan payudara yang terdiri dari kelenjar dan stroma. Kelenjar payudara terdiri dari lebih kurang 12 lobus yang terbagi lagi menjadi lobulus. Lobus tersebut tersusun secara radier menuju puting, tiap lobus akan bermuara di puting dalam duktus laktiferus yang jumlahnya antara 12 – 20 buah. Payudara terfiksasi pada kulit dan fascia otot pektoralis mayor oleh pita jaringan fibrous yang disebut *ligamentum Cooper*. Secara klinis struktur ini penting, karena bila sel kanker telah mengenai ligamentum ini maka akan menyebabkan kontraksi payudara yang menimbulkan tarikan pada kulit (*skin dimpling*) atau fiksasi dari massa kanker ke jaringan sekitarnya atau ke fascia otot pektoralis mayor sehingga tidak dapat digerakkan secara horizontal (Van De Graaff, 2001).

Puting payudara berbentuk kerucut dan umumnya terletak di daerah interkostal empat, dikelilingi oleh daerah dengan hiperpigmentasi yang disebut areola. Areola mempunyai banyak tonjolan kecil yang merupakan kelenjar

sebaceous kulit dan disebut sebagai glandula *Montgomery*. Kelenjar ini berfungsi untuk lubrikasi puting payudara pada saat menyusui (Van De Graaff, 2001).

Payudara mendapat asupan darah dari cabang arteri mamaria interna (cabang perforantes anterior) dan arteri torakalis lateralis. Kedua arteri tersebut menuju puting payudara dari sebelah atas (*cephalad*) dengan arah transversal. Aliran darah kelenjar payudara terutama terletak pada superomedial superolateral. Aliran vena mengikuti aliran arteri dengan banyak vena kecil yang membentuk pleksus di bawah areola. Pembuluh vena yang besar keluar dari pleksus ke perifer dan berakhir pada vena aksilaris dan mamaria interna. Pengetahuan dasar mengenai pola aliran vena amat penting, karena metastase kanker payudara terjadi melalui aliran vena tersebut (Van De Graaff, 2001).

Pembuluh limfe biasanya berjalan berdampingan dengan pembuluh darah. Aliran limfatik payudara berasal dari kulit, areola, dan kelenjar payudara. Arah aliran limfe berperan penting dalam terjadinya metastasis kanker payudara ke kelenjar getah bening. Aliran limfatik primer payudara adalah melalui kelompok kelenjar limfe aksila. Kelenjar getah bening aksila dibagi menjadi 3 sesuai dengan letaknya terhadap muskulus pektoralis minor, yang letaknya di tepi lateral pektoralis minor disebut level I, yang terletak di posterior pektoralis minor disebut sebagai level II, dan yang terletak di medial atau superior dari pektoralis minor disebut sebagai level III. Persarafan sensoris kulit payudara berasal dari cabang anterior dan lateral dari nervus interkostal dua sampai enam. Serabut saraf sensoris ini akan mempengaruhi aliran dan fungsi sekresi kelenjar keringat payudara (Van De Graaff, 2001).

2.2 Patobiologi Molekuler Karsinogenesis

Karsinogenesis adalah proses perubahan sekelompok sel normal menjadi sel ganas akibat pengaruh karsinogen. Karsinogen adalah bahan/material yang dapat merangsang pertumbuhan kanker atau perubahan jaringan normal menjadi kanker. Karsinogenesis bersifat *multifactor*, dan *multistage*, artinya untuk kelangsungan karsinogenesis diperlukan berbagai faktor internal dan eksternal yang secara bersama dan terus-menerus memberikan jejas kepada sel sasaran sehingga secara bertahap menimbulkan lesi mulai dari tingkat sub seluler, seluler, sampai jaringan dan organ. Karsinogenesis dapat terjadi akibat salah satu atau gabungan karsinogen, misalnya bahan kimia, radiasi, dan agen biologik termasuk virus. Perubahan akibat rangsang karsinogen tersebut mengenai sejumlah gen dari calon sel neoplasma atau sel yang mengalami transformasi. Perubahan gen tersebut pada hakekatnya merupakan berbagai bentuk mutasi atau lesi pada gen yang mengendalikan pertumbuhan sel. Perubahan genetik tersebut dapat terjadi mulai yang sederhana sampai yang sangat kompleks, dan sejumlah mutasi dapat terjadi pada sel yang sama (Bertucci, 2006). Sifat pokok sel kanker adalah terjadinya proliferasi yang tidak terkendali, penumpukan sel karena gangguan apoptosis dan kegagalan diferensiasi disertai kemampuan untuk menyebar ke lokasi yang jauh dari tempat asalnya (metastasis). Kecepatan pertumbuhan kanker yang abnormal dapat dipengaruhi oleh rangsang hormonal, kondisi vaskularisasi, aktifitas proliferasi dan derajat diferensiasi sel yang bersangkutan. Sifat kanker yang lain adalah adanya potensi untuk invasi dan destruksi baik lokal maupun sistemik, di tempat primer maupun di lokasi metastasis. Sifat tersebut seringkali menimbulkan kerusakan jaringan dan organ, sehingga mengakibatkan gangguan

fungsi, keluhan klinis, dan bahkan kematian. Kelompok gen yang berperan penting dalam karsinogenesis adalah : (a) proto onkogen dan onkogen; (b) *Tumor suppressor gen and Program Cell Death*; (c) *DNA repair genes*; (d) *Metastatic regulating gene (androgenic gene, angiogenic gene)* (Feinmesser, 2000).

Sampai saat ini mekanisme kejadian kanker masih belum diketahui secara pasti, menurut Forbus terdapat dua cara yang memungkinkan terjadinya penyakit atau timbulnya kanker yaitu faktor dari dalam, sebagai akibat beberapa kekeliruan duplikasi gen saat reproduksi seluler. Kesalahan ini dapat terjadi secara spontan dan tidak tergantung dari pengaruh eksternal tetapi lebih disebabkan karena faktor intrinsik. Faktor dari luar seperti bahan kimia, radiasi, dan agen biologis seperti virus diduga dapat menyebabkan kanker pada manusia (Bertucci, 2006).

Tumor terjadi akibat kegagalan pengendalian sel sehingga sel dapat melepaskan diri dari mekanisme pertumbuhan normal. Terdapat tiga golongan gen pengatur pertumbuhan normal yang menjadi sasaran perubahan genetik yaitu gen pencetus pertumbuhan atau protoonkogen, gen penghambat pertumbuhan atau gen supresor kanker atau disebut juga anti onkogen, dan gen yang mengatur kematian sel secara terprogram disebut apoptosis. Gen keempat yang memperbaiki kerusakan DNA disebut gen perbaikan DNA juga berperan penting dalam karsinogenesis.

Karsinogenesis adalah proses bertingkat dan kompleks pembentukan neoplasma atau tumor. Neoplasma diartikan sebagai massa jaringan yang abnormal, tumbuh berlebihan, dan tidak terkoordinasi serta pertumbuhan yang terjadi terus –menerus meski rangsang pertumbuhan telah dihilangkan. Karsinogenesis merupakan proses multistep pada tingkat fenotip dan genotip

dengan beberapa fase seperti fase inisiasi, fase laten, fase promosi, dan fase progresi ganas. Neoplasma ganas mempunyai ciri fenotip tambahan seperti tumbuh berlebihan, invasif dan kemampuan untuk metastasis. Pada tingkat molekuler progresi tumor merupakan akibat dari akumulasi lesi genetik sebagai akibat defek perbaikan DNA. Keadaan fisiologis proses pertumbuhan sel dibagi menjadi beberapa tahap sebagai berikut :

1. Pengikatan faktor pertumbuhan oleh reseptor faktor pertumbuhan yang berada pada membran sel.
2. Aktivitas reseptor faktor pertumbuhan yang kemudian mengaktifkan protein penghantar rangsangan yang berada pada bagian dalam membran sel.
3. pengaliran rangsangan pertumbuhan melalui sitoplasma ke inti sel oleh *second messenger*.
4. Merangsang dan mengaktifkan faktor pengatur inti sehingga terjadi transkripsi DNA.
5. Sel masuk ke dalam siklus pembelahan. Fase G1, fase S, Fase G2 kemudian fase M.

Mekanisme onkogen merangsang pertumbuhan sel neoplastik :

1. Mengkode pembuatan protein yang berfungsi sebagai pertumbuhan yang berlebihan dan merangsang diri sendiri (*autokrin*) misalnya *c-sis*.
2. Memproduksi reseptor pertumbuhan yang tidak sempurna yang memberi isyarat pertumbuhan terus – menerus meskipun tidak ada rangsangan dari luar, misalnya *c-erb*.

3. Amplifikasi gen, terbentuk faktor pertumbuhan yang berlebihan sehingga sel tumor sangat peka terhadap faktor pertumbuhan berkadar rendah yang berada di bawah ambang rangsang normal, misal *c-neu*.
4. Memproduksi protein yang berbatas langsung dengan inti yang merangsang pembelahan sel, misalnya *c-myc*.

Tumor tidak hanya terbentuk oleh karena aktivasi onkogen yang bekerja dominan tetapi juga sebagai akibat hilangnya atau tidak aktifnya gen yang bekerja menghambat pertumbuhan sel disebut sebagai anti onkogen yang bekerja resesif. Pada pertumbuhan diferensiasi sel normal, anti onkogen bekerja menghambat pertumbuhan dan merangsang diferensiasi sel pada alel tipe *wild*.

Kerusakan DNA yang disebabkan oleh radiasi, sinar UV atau bahan karsinogenik kimia akan menyebabkan peningkatan kadar protein p53. akumulasi p53 tipe *wild* berikatan dengan DNA dan merangsang transkripsi beberapa gen yang memerantarai dua pengaruh utama p53 yaitu penahanan siklus sel (*cell cycle arrest*) dan apoptosis. Penahanan siklus sel disebabkan oleh transkripsi *Cell Dependent Kinase* (CDK) inhibitor p21 yang tergantung pada protein p53. Penghentian siklus sel ini akan memberikan waktu untuk memperbaiki kerusakan DNA yang diakibatkan oleh agen mutagenik. Protein p53 juga membantu proses secara langsung dengan memicu transkripsi *Growth Arrestand DNA Damage* (GADD45). Bila kerusakan DNA ini tidak dapat diperbaiki maka p53 akan memicu aktivasi gen pro apoptosis untuk mengapoptosis sel tersebut, tetapi bila kerusakan dapat diperbaiki maka sel akan kembali normal (Coronella, 2001). Penghentian siklus sel penting oleh karena akan memberikan waktu pada sel

untuk mengoreksi kesalahan DNA yang mungkin terjadi selama proses mitosis (Zamai, 2007).

2.3 Karsinoma Payudara Tipe *Medullary*

Neoplasma secara harfiah berarti “pertumbuhan baru”. Suatu neoplasma, sesuai definsi Willis, adalah massa abnormal jaringan yang pertumbuhannya berlebihan dan tidak terkoordinasikan dengan pertumbuhan jaringan normal serta terus demikian walau pun rangsangan yang memicu perubahan tersebut telah terhenti. Hal mendasar tentang asal neoplasma adalah hilangnya responsivitas terhadap faktor pengendali pertumbuhan yang normal. Tumor ganas (maligna) secara kolektif disebut kanker, yang berasal dari kata latin untuk kepiting, tumor melekat erat ke seluruh permukaan yang dipijaknya, seperti kepiting. Ganas, apabila diterapkan pada neoplasma, menunjukkan bahwa lesi dapat menyerbu dan merusak struktur di dekatnya dan menyebar ke tempat yang jauh (Robbins, 2007).

Karsinoma *medullary* payudara dibatasi dengan baik dengan permukaan berwarna abu yang homogen, kendatipun pendarahan dan nekrosis pada beberapa kasus juga ditemukan. Secara mikroskopik, tumor terdiri dari sel tumor besar, yang menunjukkan penandaan aktivitas mitosis namun tanpa pleomorfisme nuklear. Fitur karakteristik dari kanker payudara tipe *medullary* adalah infiltrasi limfositik stroma tumor yang padat. Secara morfologi dan biologi, karsinoma ini berbeda dari sub tipe karsinoma invasif yang dikarakterisasi oleh keberadaan struktur sel yang besar, solid dan pleomorfis dengan tepi (*border*) sel berbeda yang memicu terjadinya penampilan *syncytial*. Pada mammogram, kanker payudara tipe *medullary* tampak sebagai massa non kalsifikasi yang bundar atau

oval dengan beragam tingkat lobulasi marginal. Selain gambaran anaplastik sitologi dan tingkat mitosis yang tinggi, prognosis bagi kanker payudara tipe *medullary* secara umum lebih baik daripada tipe infiltrasi duktal karsinoma lainnya, dengan tingkat *survival rate* 10 tahun sebesar 84%, yang secara signifikan lebih tinggi daripada pasien kanker payudara tipe *non-medullary* (Bertucci, 2006).

Ketiadaan neutrofil mengindikasikan bahwa leukosit yang menginfiltrasi tumor di dalam kanker payudara tipe *medullary* terakumulasi sebagai respon atas stimulus tertentu dan bukan atas respon peradangan non spesifik yang disebabkan oleh nekrosis tumor atau bakteri. Pemicu aktivitas tumor terkait dengan makrofag mengekspresikan sejumlah faktor pemicu tumor, seperti faktor pertumbuhan, mediator angiogenik, enzim yang mendegradasi matriks ekstraseluler dan sitokin sel radang. Sitokin menyebabkan infiltrasi leukosit di lokasi peradangan yang dapat diinduksi, biasanya, dengan sitokin *pro-inflammatory*. *Tumor Associated Macrophages* (TAM) mungkin berperan bagi progresi tumor dengan pelepasan *intermediate* oksigen reaktif. Produk tersebut dapat menginduksi perubahan yang menyebabkan peningkatan kerusakan DNA dan menghasilkan diversitas di dalam tumor. Oleh karena itu, tumor yang menginfiltrasi limfosit B dapat memicu atau mendorong terjadinya pengaruh supresif tumor utama di dalam kanker payudara tipe *medullary* (Dent, 2007).

2.4 Karsinoma Payudara Tipe *Non Medullary*

Kanker payudara tipe *non medullary* dalam penelitian ini termasuk dalam kategori kanker payudara duktus invasif. Tumor disebut invasif apabila sel tumor

telah menembus membran basalis di sekeliling stuktur payudara dan menyebar ke jaringan sekitarnya. Karsinoma invasif dikelompokkan berdasarkan jenis histologis yang berbeda. Diameter karsinoma invasif beragam mulai kurang dari 10 mm sampai lebih dari 80 mm, tetapi yang paling sering ditemukan berukuran antara 20 – 30 mm. Secara klinis teraba benjolan kenyal keras dan terdapat kerutan pada kulit yang menutupi atau otot di bawahnya. Permukaan kulit juga menunjukkan gambaran seperti kulit jeruk (*peau d'orange*), lekukan akibat penyebaran ke limfatik. Papilla mamma dapat mengalami penarikan akibat adanya kerutan dan kontraksi ligamen intramamma (Tot, 2000).

Karsinoma duktus invasif merupakan sebagian besar karsinoma mamma infiltratif (lebih dari 85%). Secara makroskopis, karsinoma ini biasanya mempunyai konsistensi *scirrhous* yang menunjukkan terdapat reaksi jaringan fibrosa yang menonjol terutama pada bagian sentral tumor. Keadaan ini mengakibatkan karsinoma tampak padat keputihan, pada sayatan tampak kasar. Terlihat garis – garis kekuningan akibat adanya jaringan elastis di dalam tumor. Karsinoma dengan reaksi stroma yang menonjol mempunyai tepi yang ireguler, menyebar ke jaringan lemak sekitar atau parenkim mamma.

Secara histologis, sel tumor tersusun dalam kelompok, sel batang atau struktur mirip kelenjar. Ukuran kelompok sel yang padat, stroma prominen, terletak di bagian sentral dengan bagian perifer yang lebih bersifat seluler. Pengumpulan jaringan elastis (elastosis) di sekitar duktus atau di dalam stroma sering ditemukan pada tumor dengan reaksi *scirrhous*.

Derajat diferensiasi tumor didasarkan pada perluasan dimana ada kemiripan dengan mamma yang tanpa tumor, yaitu pola struktur sel memiliki

kemiripan dengan kelenjar atau berupa kelompok sel solid, derajat pleiomorfisme inti, dan jumlah mitosis yang ada. Karsinoma duktus infiltratif yang berdiferensiasi baik cenderung kurang agresif dibandingkan dengan tumor yang berdiferensiasi buruk, yang tersusun atas kelompok sel pleiomorfik disertai jumlah mitosis yang banyak (West, 2001).

2.5 Biologi Molekuler Karsinoma Payudara

Fakta bahwa sel tumor dapat mengakibatkan berbagai jenis cacat genetik yang menunjukkan bahwa ketahanan hidup atau respon terhadap terapi kanker tidak terkait dengan cacat genetik tunggal melainkan merupakan hasil dari kombinasi dari berbagai cacat. Mekanisme molekuler instabilitas genom sel kanker payudara yang sering terdeteksi kurang dipahami dengan baik, namun beberapa studi telah menunjukkan asosiasi dengan mutasi dalam p53, gen BRCA1 atau BRCA2. Mutasi-mutasi BRCA1 dan BRCA2 telah ditemukan pada lebih dari 90% dari seluruh kasus kanker payudara herediter, namun berlawanan dengan BRCA1, mutasi BRCA2 juga menimbulkan peningkatan resiko kanker payudara pada pria. p53 dan BRCA1/BRCA2 merupakan gen supressor tumor yang terlibat di dalam apoptosis, regulasi transkripsi, perbaikan DNA ikatan ganda, menghentikan siklus sel, dan lain - lain. Peran baru bagi BRCA1 di dalam pembentukan heterokromatin pada kromosom X dan ubiquitinasi telah teridentifikasi. Tumor yang terkait dengan BRCA1 merupakan reseptor estrogen (ER) negatif, sementara mayoritas dari kanker yang berhubungan dengan BRCA2 adalah ER-positif. Sebagai tambahan, telah disebutkan bahwa ekspresi ER di dalam tumor yang terkait dengan BRCA1 berhubungan dengan usia pasien.

Mutasi gen supresor tumor yang paling umum terdeteksi pada sekitar 1/4 dari tumor payudara adalah pada gen p53. Mutasi pada gen p53 ditemukan pada 20 – 40% kanker payudara invasif dan overekspresi mereka terdeteksi pada 37 – 77% dari tumor-tumor yang terkait dengan kanker payudara. Hubungan fungsional langsung antara p53 dan BRCA1 pertama kali disebutkan oleh observasi bahwa hilangnya p53 secara parsial dapat menolong letalitas embrionik pada tikus *knockout* BRCA1. Karsinoma payudara dengan mutasi p53 secara konsisten berhubungan dengan uji kadar logam negatif untuk ER dan reseptor progesteron (PR), dan secara berbeda berhubungan dengan amplifikasi dari beberapa onkogen, seperti HER-2/neu, c-myc dan ras. Overekspresi protein HER2 jarang sekali ditemukan pada karsinoma payudara dengan mutasi BRCA1. Akan tetapi, overekspresi HER2/neu ditemukan pada 25 – 30% kasus kanker payudara. Alterasi atau perubahan pada gen-gen tersebut lebih umum terjadi bagi kanker payudara tipe *medullary*. Karsinoma *medullary*, yang dapat mengakibatkan mutasi p53 dan Chk2 (homolog Rad53 manusia), memiliki frekuensi metilasi transkripsi dependen yang mempengaruhi BRCA1. Kanker payudara tipe *medullary* menunjukkan peningkatan apoptosis sel tumor, peningkatan jumlah faktor penghambat metastasis, peningkatan tingkat adhesi molekul ICAM-1 dan respon imun tubuh yang efektif. Gen yang paling sering terlibat di dalam karsinogenesis payudara (MYC, CCND1, EGFR dan CCNE) sangat jarang sekali diamplifikasi di dalam kanker payudara tipe *medullary*. Sejauh ini, 265 gen yang terlibat di dalam susunan dan perubahan bentuk sitoskeleton diidentifikasi sebagai gen yang kurang diekspresikan pada kanker payudara tipe *medullary* basa melalui uji kadar logam *microarray*. Diantaranya adalah *actin* (ACTG2, ACTA2), α -actinin

(ACTN1), rantai cahaya myosin (MYL9), β -tropomyosin (TPM2) dan beberapa regulator atau protein-protein terkait. Investigasi terkini telah mengidentifikasi sejumlah gen, termasuk beberapa anggota GAGE dan famili-famili gen faktor pertumbuhan insulin yang mengikat protein (*insulin growth factor binding protein*) atau IGFBP, Vav1 (*guanine nucleotide exchange factor*) atau GEF, monoglikosid lipase dan enzim NADP⁺ dependen *malic*, yang terlihat merubah ekspresi pada kanker payudara tipe *medullary versus* kanker payudara duktal. Melalui analisa *immunohistochemical*, ditetapkan bahwa ekspresi monoglisid lipase terbatas pada kanker payudara duktal, dan ditemukan pada 77% dari tumor tersebut, sementara Vav1 terbatas pada kanker payudara tipe *medullary* dan terlihat pada 60% tumor. Kanker payudara tipe *medullary* berbeda dari karsinoma duktal pada tingkat ekspresi antigen limfositik HLA-DR, salah satu antigen kelas MHC II (*major histocompatibility complex*), yang umum ditemukan pada sel yang mengalami nukleasi. Diketahui bahwa hilangnya gen SFRP1 (*secreted Frizzled-related protein 1*), suatu protein supressor tumor putatif yang terlibat di dalam jalur WNT, telah diamati pada sebagian besar karsinoma ductal yang invasif namun tidak terlihat pada kanker payudara tipe *medullary*. Ketiadaan ekspresi protein Bcl-2 inhibitor apoptosis di dalam kanker payudara tipe *medullary* juga telah mendeskripsikan deteksi perubahan di dalam gen-gen tersebut akan memungkinkan untuk memahami kealamian atau sifat dari kanker payudara tipe *medullary* dengan lebih jelas (Kotlan, 2005).

2.6 Respon Imun Karsinoma Payudara

Respon imun merupakan reaksi kompleks sebagai cerminan proses imunologik dalam upaya mempertahankan homeostasis. Respons imun sebenarnya merupakan fenomena dimana sistem imun memberi tanggapan terhadap kehadiran imunogen. Sebagian besar imunogen disusun oleh protein, dapat dalam bentuk lipoprotein, glikoprotein maupun nukleoprotein. Protein makromolekular ($BM > 40.000$) ini biasanya memerlukan pengenalan oleh limfosit T atau B terlebih dulu untuk dapat menimbulkan respons terbentuknya antibodi sehingga digolongkan dalam *T cell dependent antigen*. Selain protein, respons imun dapat terjadi bila menjumpai hidrat arang (polisakarida). Lipid dan asam nukleat biasanya tidak imunogenik, tetapi menjadi imunogenik bila diikat oleh *carrier* protein. Masih sering dijumpai kerancuan mengenai istilah imunogen dengan antigen. Antigen adalah suatu bahan atau molekul yang mempunyai kemampuan bereaksi dengan antibodi. Pada umumnya imunogen adalah suatu antigen, tetapi tidak selalu antigen dapat menimbulkan respons terhadap suatu imunogen. Contoh antigen yang bukan imunogen antara lain lipid dan asam nukleat. Respons imun yang merupakan rangkaian proses yang dipicu oleh rangsangan antigen atau imunogen, bertujuan untuk memusnahkan pemicu rangsangan tersebut. Dalam kondisi badan yang sehat maka sistem imun bekerja secara optimal sehingga individu terhindar dari dampak yang tidak menguntungkan akibat masuknya antigen. Respons imun yang merupakan cerminan dari ketahanan tubuh ini dapat dipengaruhi oleh imunomodulator antara lain hormon (misal kortisol), neuropeptida, protein (misal vaksin bakteri), obat – obatan dan radiasi. Bahan yang dapat memperbaiki fungsi sistem imun dengan

merangsang sistem disebut imunomodulator, sedangkan yang menekan atau menurunkan fungsinya disebut immunosupresor. Respons imun sebagai cerminan kualitas ketahanan tubuh ini pada dasarnya dapat dibagi menjadi 3 tingkatan atau tahap reaksi, yaitu tahap I (*afferent limb, recognition phase*) yang menyangkut semua proses pengangkutan dan pengenalan antigen oleh sistem imun meliputi penangkapan antigen, pemrosesan, dan penyajian fragmen antigen oleh makrofag. Tahap II (*central limb, activation phase*), menyangkut semua proses yang menghasilkan aktivasi efektor imunologik antara lain interaksi makrofag dengan limfosit T atau B, proliferasi dan diferensiasi limfosit T atau B menjadi sel efektor spesifik dan memori, produksi sitokin dan antibodi. Tahap III (*efferent limb, effector phase*) menyangkut proses penghancuran antigen atau sel sasaran (Atwood, 2006).

Mekanisme respons imun diawali dengan makrofag yang menjumpai benda asing (misalnya protein, peptida) atau antigen dari sel yang terinfeksi mikroba atau sel yang dianggap asing. Selanjutnya makrofag akan memproses antigen tersebut sedemikian rupa dan mempresentasikannya melalui molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC) yang sesuai ke permukaan sel. Masuknya antigen ke dalam sel makrofag dengan cara endositosis atau pinositosis, kemudian terjadi proses denaturasi atau proteolisis di dalam endosom. Fragmen antigen yang terdiri dari rantai peptida dan bersifat hidrofobik dipresentasikan pada permukaan sel dengan molekul MHC. Kompleks antigen dan MHC yang ada di permukaan sel makrofag ini dapat dikenali oleh limfosit T atau B sebagai konfigurasi asing oleh reseptor permukaan (TCR). Antigen mikroorganisme terutama virus maupun sel kanker imunogenik yang ditampilkan

bersama molekul MHC kelas I akan dapat dikenal oleh limfosit T_c (sT CD8) sedangkan antigen yang disajikan bersama molekul protein MHC kelas II dapat dikenali oleh limfosit T_h (sT CD4). Limfosit T dapat mengenal antigen di membran makrofag (APC) melalui TCR berdasarkan susunan asam amino dalam rantai peptida. Pengenalan ini akan memicu rangkaian reaksi sel imunologik untuk merespons antigen tersebut.

Selain makrofag, sel lain yang dapat bertindak sebagai APC adalah limfosit B karena mempunyai *surface immunoglobulin* (sIg) sebagai reseptor di membran sehingga dapat mengenal imunogen secara langsung. Interaksi antara kompleks antigen – MHC dengan reseptor dari sel imunokompeten menyebabkan terjadinya rangsangan terhadap sel imunokompeten tersebut untuk proliferasi dan diferensiasi menjadi sel efektor serta mengeluarkan sitokin dan antibodi yang selanjutnya akan mempengaruhi sel imunokompeten lainnya.

Respon tubuh terhadap antigen (imunogen) ini diatur oleh *immune response gene* (*Ir-gene*) yang berada di kromosom 6 lengan pendek, dekat dengan daerah MHC. Gen MHC yang pada leukosit manusia disebut sebagai gen *Human Leucocyte Antigen* (HLA) secara langsung mengatur respons imun seluler. Selanjutnya melalui sub populasi limfosit T *helper* dan *suppresor* akan mengatur respons imun humoral. Gen HLA akan mengkode pembentukan protein yang terlibat dalam respon imun, yaitu protein MHC kelas I dan kelas II.

Karsinoma *medullary* payudara, salah satu tumor kelenjar mamalia yang jarang terjadi, dikarakterisasi oleh sebuah kecenderungan memiliki pola pertumbuhan yang *syncytial* dan solid, margin tumor berbatas tegas, pleomorfis nukleus yang tinggi dengan banyak mitosis, dan infiltrasi limfositik yang

menyertai dominan. Pada beberapa studi, ekspresi HLA-DR terjadi dengan sedikit infiltrasi limfosit terkait, mengimplikasikan bahwa adakalanya ekspresi MHC, yang diperlukan bagi presentasi antigen untuk limfosit *T-helper* dan *T-sitotoksik*, menentukan kualitas intrinsik dari tumor. Ditemukan bahwa baik komponen antigen HLA-DR dan $\beta 2$ mikroglobulin dari sistem antigen MHC-I dan MHC-II, secara berurutan diekspresikan dalam karsinoma *medullary* payudara. Antigen MHC-I dan MHC-II tidak hanya dijadikan sebagai sebuah penanda bagi diagnosis, namun juga merupakan sebuah indikator dari perilaku biologis. Oleh karena itu, imunoterapi dengan sitokin diketahui dapat menginduksi ekspresi MHC-I dan MHC-II yang dapat menginduksi sel tumor payudara untuk mengekspresikan antigen MHC-I dan MHC-II. Hal ini dapat meningkatkan immunogenisitas dan kepekaan terhadap sitotoksik dan sel *T-helper*, dan mengaktifkan infiltrasi limfosit untuk mengalami proliferasi *in situ*. Temuan ekspresi MHC-I dan MHC-II yang dominan pada kanker payudara yang jarang namun relatif baik ini akan berperan bagi pemahaman mengenai dan pendekatan terapi bagi penderita karsinoma payudara (Paul, 2000).

2.6.1 Respon Imun Seluler

Untuk melawan mikroorganisme intraseluler dan sel kanker yang mengandung antigen tumor di permukaan sel, diperlukan peran respons imun seluler (*cell-mediated immune response*) yang dilaksanakan oleh sel efektor sistem imun terutama makrofag, sel NK, limfosit T sitotoksik (CTL), dan sel *lymphokine activated killer (LAK)*.

Pada awal makrofag atau sel lainnya yang berperan sebagai APC menangkap antigen (misalnya protein, peptida) selanjutnya terjadi endositosis/fagositosis. Antigen yang berada dalam fagosom dihancurkan melalui mekanisme oksidatif maupun non oksidatif antara lain oleh enzim lisosim, enzim proteolitik (*protease*), dan NO (*Nitric Oxide*) menjadi fragmen antigen (*peptide*) yang kemudian disajikan di permukaan membran makrofag (APC) bersama molekul MHC yang sesuai.

Peptida yang berasal dari antigen yang dicerna di dalam fagosom (fagolisosom) dan disajikan bersama molekul MHC kelas II akan dapat dikenali oleh limfosit Th (CD4) melalui reseptor di permukaan (TCR). Interaksi antara kompleks antigen – MHC pada APC dengan kompleks CD3 – TCR pada limfosit CD4 akan mengawali peristiwa biokimia di dalam sel CD4 yang berefek aktivasi.

Limfosit Th (CD4) yang telah diaktifkan baik karena kontak MHC – TCR atau akibat rangsangan IL-1 yang dihasilkan makrofag aktif (*activated macrophages*) selanjutnya akan berproliferasi dan diferensiasi menjadi subsetnya yaitu Th1 dan Th2 yang diikuti dengan produksi berbagai faktor kemotaktik dan sitokin. Faktor kemotaktik akan menarik lebih banyak makrofag, granulosit, dan limfosit ke tempat antigen berada. Selain faktor kemotaktik, kontak antara antigen (peptida) yang ditampilkan bersama MHC kelas II dengan TCR dari limfosit Th (CD4) merupakan sinyal baik makrofag maupun limfosit Th (CD4) memproduksi dan melepaskan berbagai sitokin sehingga terjadi aktivasi dari berbagai sel imunologik yang terlibat dalam respons imun.

Makrofag yang telah diaktifkan (*activated macrophages*) karena kontak antigen – TCR, mengeluarkan berbagai sitokin (antara lain IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α ,

GM-CSF), senyawa NO dan O_2^- (superoksida). IL-12 berefek meningkatkan aktivitas Th1 dalam memproduksi berbagai sitokin (*cytokine profile Th1*). IL-1 berefek peningkatan kemampuan makrofag dalam menghancurkan antigen (efek autokrin). Selain karena interaksi makrofag dengan limfosit Th (CD4), produksi IL-1 oleh makrofag aktif akan lebih meningkat karena adanya antigen yang diproses dalam fagosom. Sitokin IL-1, TNF- α dan senyawa NO dan O_2^- berefek membunuh mikroorganisme dan sel kanker. Penghancuran antigen oleh makrofag (*macrophage cell mediated killing*) akan lebih ditingkatkan dengan adanya berbagai sitokin yang dihasilkan oleh limfosit Th (CD4) antara lain *macrophage activating factor* (MAF), *specific macrophage migration inhibitory factor* (SMAF), *macrophage fusion factor* (MFF), *migration inhibitory factor* (MIF), IFN γ , IL-12, dan IL-3. IL-1 dapat mengaktifkan *resting T lymphocyte* menjadi CTL, yang kemudian diketahui bahwa sebagian besar CTL terdiri atas T *cytotoxic*. IL-1 menginduksi proliferasi dan diferensiasi limfosit Th (CD4 Th0) menjadi sel Th1, sedangkan proliferasi menjadi sel Th2 dipicu oleh IL-4 dan IL-10. TNF- α berperan sebagai mediator peradangan dan mempunyai efek sitotoksitas bila kontak dengan sel target. TNF- α diduga menyebabkan kematian sel kanker, dengan cara menginduksi apoptosis. Produksi TNF- α dapat dihambat oleh steroid.

Antigen (peptida) yang disajikan bersama molekul MHC kelas I dipermukaan APC akan dikenali oleh limfosit T sitotoksik (T_c). Molekul CD8 dapat mengikat MHC kelas I yang terdapat dipermukaan semua sel berinti. Mikroorganisme intrasel dan sel kanker yang memiliki antigen disajikan melalui MHC kelas I akan dikenal oleh limfosit T sitotoksik (T_c) yang telah diaktifkan menjadi CTL, sehingga terjadi lisis sel secara langsung. Aktivasi limfosit T

sitotoksik (T_c) dimulai bila TCR dari limfosit T_c mengenali dan mengikat kompleks antigen – MHC kelas I, memicu produksi perforin dan senyawa sitotoksik antara lain *granzymes*. Pada mulanya menempel pada sel target terutama sel yang terinfeksi virus atau sel kanker melalui ikatan *fas-ligan (fasL)* dengan perantara ion kalsium. Masuknya ion kalsium secara bersamaan dengan faktor sitotoksik seperti *granzymes* dari CTL melalui pori yang dibuat oleh perforin ke dalam sel target akan menyebabkan fragmentasi DNA. Selain kebocoran sel, juga terjadi kematian sel sasaran diinduksi oleh fragmentasi DNA. Proliferasi limfosit T_c dipicu oleh IL-2 yang antara lain dihasilkan oleh sel $Th1$ tetapi juga dihasilkan oleh limfosit T_c (efek autokrin). Limfosit T_c (CD8) maupun limfosit T yang telah diaktifkan oleh IL-2 sehingga menjadi CTL menghasilkan *serine protease*, $TNF-\beta$, dan $IFN-\gamma$ yang dapat meningkatkan aktivitas makrofag dan sel NK, juga berefek mencegah penyebaran mikroorganisme ke sel yang lain (Paul, 2000).

2.6.2 Respons Imun Humoral

Aktivasi *resting T lymphocyte* merupakan peristiwa yang menentukan untuk berlangsungnya respons imun humoral. Interaksi antara limfosit Th (CD4) melalui TCR dengan antigen yang disajikan oleh APC melalui MHC kelas II, atau interaksi limfosit t_c (CD8) dengan sel target. APC yang teraktivasi menghasilkan IL-1 yang dapat menginduksi proliferasi dan diferensiasi limfosit T. Interaksi ini akan mengawali berbagai peristiwa reaksi biokimia dalam limfosit Th (CD4) yang menghasilkan ekspresi reseptor IL-2 dan produksi IL-2 yang diperlukan untuk proliferasi sel selanjutnya. Sebagian limfosit T selanjutnya berfungsi

sebagai limfosit Th untuk membantu limfosit B menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi, sebagian lagi menjadi sel memori. Agar supaya limfosit B dapat dirangsang oleh limfosit T maka molekul MHC kelas II pada permukaan kedua sel harus sama. Limfosit B yang sudah diaktifkan cukup dirangsang oleh sitokin antara IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IFN- γ yang dihasilkan limfosit Th (CD4) untuk memproduksi antibodi. Selain menstimuli limfosit Tc (CD8) dan makrofag, IL-2 yang dihasilkan limfosit Th (CD4) yang telah diaktifkan digunakan untuk proliferasi limfosit T itu sendiri (efek autokrin).

Mekanisme kerja respons imun humoral diawali proses proliferasi dan diferensiasi limfosit B menjadi klon sel plasma yang memproduksi antibodi. Sel plasma yang mengandung antibodi (imunoglobulin) melepaskan antibodi spesifik terhadap antigen tertentu. Antibodi akan berikatan dengan antigen membentuk kompleks antigen – antibodi yang dapat mengaktivasi komplemen, atau sebagai opsonin terhadap sel fagosit seperti neutrofil dan sel NK yang berakibat hancurnya antigen. Agar limfosit B berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi diperlukan bantuan sinyal sel lain, terutama sitokin yang diproduksi sel Th2 antara lain IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13 dan IL-1 yang dihasilkan oleh makrofag. IL-4 akan memicu proliferasi sel Th2 lebih lanjut, sedangkan IL-5 (disebut juga *B cells Growth Factor*) bersama dengan IL-4 akan memacu proliferasi limfosit B. Selain oleh limfosit Th (CD4) melalui sitokin yang diproduksi sel Th1 dan Th2, keseimbangan produksi antibodi oleh limfosit B dan sel plasma diatur oleh sel Th2 (Abbas, 2008).

Limfosit B juga berperan sebagai APC karena mempunyai reseptor permukaan (TCR) sehingga dapat menangkap antigen secara langsung atau antigen yang disajikan bersama molekul MHC kelas II. Interaksi ini selanjutnya merupakan sinyal bagi limfosit B untuk proliferasi dan diferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi imunoglobulin. Antibodi yang dilepaskan dapat melapisi antigen atau permukaan sel target sehingga terbentuk kompleks antigen – antibodi (opsonisasi). Sel NK yang mempunyai reseptor terhadap Fc antibodi tersebut dapat berikatan dengan antigen atau sel target yang menghancurkan sel tersebut. Mekanisme lain dikenal sebagai *Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity*. Seperti pada CTL, hancurnya sel target oleh sel NK karena adanya pengaruh perforin, serine protease, dan TNF- β (Abbas, 2008).

2.7 Mekanisme Kematian Sel

2.7.1. Nekrosis

Pada awalnya, kematian sel dikenal melalui nekrosis dan onkosis. Nekrosis adalah kematian sel karena adanya kerusakan sistem membran. Kerusakan membran ini disebabkan adanya suatu enzim lisozim. Aktivitas enzim lisozim dapat terjadi karena adanya kerusakan sistem membran, oleh suatu faktor tertentu, yang mengakibatkan membran pembungkus enzim lisozim mengalami kebocoran. Adanya kebocoran ini mengakibatkan enzim lisozim tumpah ke sitosol dan akhirnya mencerna protein, baik yang berada di sitosol maupun protein penyusun sistem membran tersebut (Sudiana K, 2008). Nekrosis terjadi setelah suplai darah hilang atau setelah terpajan toksin dan ditandai dengan

pembengkakan sel, denaturasi protein, dan kerusakan organela. Jalur lintas kematian sel tersebut dapat menyebabkan disfungsi berat jaringan. (Cotran, 2007).

2.7.2 Onkosis

Onkosis adalah kematian sel karena adanya faktor iskemia (kekurangan oksigen). Adapun mekanisme terjadinya onkosis dimulai dari rendahnya kadar oksigen di dalam sel. Kondisi tersebut mengakibatkan sel mengalami gangguan pada pembentukan ATP (*Adenosine Tri Phosphate*), sementara rendahnya ATP dapat mengakibatkan rendahnya gangguan pada proses pompa natrium (*sodium pump*) sehingga di dalam sel tersebut terjadi peningkatan natrium. Tingginya kadar natrium di dalam sel (*Na-intracellular*) mengakibatkan air masuk ke dalam sel, sehingga sel mengalami pembengkakan (*swelling*) atau dikenal dengan “*oncos*” dalam bahasa Yunani, dan akhirnya sel mengalami lisis atau pecah (Cotran, 2007).

2.7.3 Apoptosis

Apoptosis adalah jalur lintas kematian sel melalui mekanisme genetik (kerusakan atau fragmentasi kromosom/DNA). Mekanisme kematian sel yang terprogram memungkinkan individu mengontrol jumlah sel dalam jaringan dan mengeliminasi berbagai sel yang mengancam kelangsungan hidup dari individu tersebut. Apoptosis memainkan peran sentral dalam menjaga homeostasis karena apabila mekanismenya mengalami suatu penyimpangan maka dapat menyebabkan suatu gangguan yang bersifat fatal. Apoptosis merupakan hasil dari program intraseluler yang bertingkat (*cascade*), terutama dipengaruhi oleh aktivasi

beberapa *Cystein Dependent Aspartate Directed Protease (Caspase)*. Beberapa produk gen sangat diperlukan untuk apoptosis pada mamalia misalnya *Interleukin 1 β -Converting Enzyme (ICE)*, atau disebut juga *caspase*, *Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)*, serta produk gen golongan *Bcl-2*. Pada prose apoptosis, mitokondria juga memiliki peran sentral terutama dalam perubahan transpor elektron. Hilangnya potensial membran dari mitokondria, lepasnya *cytochrome-c*, serta reduksi oksidasi sel akan berubah oleh pengaruh berbagai protein golongan *Bcl-2*.

Komitmen kematian sel pada apoptosis selain dipicu dari dalam (faktor intrinsik), juga dapat dirangsang oleh sinyal kematian dari luar (faktor ekstrinsik), yang dikenal sebagai *death promoting ligand*. Ligan kematian inilah yang kemudian akan mengikat reseptor yang ada di permukaan sel, bagian dari reseptor akan berubah bentuk dan dapat mengikat protein adaptosis sebagai pemicu terjadinya apoptosis. Secara bersamaan reseptor dapat menerima berbagai sinyal untuk menggerakkan siklus pembelahan sel. Reseptor yang berikatan dengan ligan, disebut juga *Fas*, antara lain *CD95/Fas/Apo*, *TNF-R1/p55*, *Apo-3*. Apoptosis merupakan proses kematian sel yang terprogram secara genetik, ditandai dengan fragmentasi DNA, kondensasi kromatin dan inti, diikuti fragmentasi inti serta penonjolan sitoplasma, terjadi keluarnya fragmen inti yang kemudian difagositosis oleh makrofag. *Caspase* merupakan produk gen yang berperan dalam proses apoptosis. Enzim ini mengandung banyak sistein dan memotong protein sasaran pada gugus aspartat tertentu. Pada manusia telah diidentifikasi 10 *caspase* yang memiliki kemiripan dalam urutan polipeptida, dan aktif setelah mengalami proteolisis spesifik. *Caspase* dibedakan dalam dua kelas

yaitu *caspase* inisiator yang diaktifkan oleh isyarat dari protein lain, dan *caspase* eksekutor (pelaksana) yang diaktifkan oleh *caspase* inisiator. *Caspase* mencernakan protein seperti *cytoplasmic endonuclease-sequestering protein*, suatu kompleks protein yang berfungsi mengikat endonuklease DNA dalam sitoplasma, yang kemudian membebaskan endonuklease memasuki inti dan mencerna DNA. *Caspase* yang lain mencernakan aktin, suatu komponen sitoskeleton yang mendasari membran nukleus, diikuti dengan kerusakan struktur sel. Peran mitokondria dalam apoptosis banyak dibicarakan sejak ditemukannya protein golongan *Bcl-2* yang berlokasi di membran luar mitokondria oleh Hockenbery pada tahun 1990. Dalam perkembangannya menunjukkan bahwa protein *Bcl-2* dapat menghambat apoptosis (*Bcl-2* dan *Bcl-XL*) maupun memicu apoptosis (*Bax* dan *Bad*). Mitokondria memproduksi *cytochrome-c* yang mempunyai peran penting mendorong sel untuk melakukan apoptosis melalui pengaktifan *Caspase* yang diperantai *Apaf-1*. mekanisme pelepasan *cytochrome-c* dari mitokondria dapat dihambat oleh *Bcl-2* dan *Bcl-XL*. Tumor supresor gen p53 juga sangat berperan dalam mengendalikan apoptosis dengan merangsang gen kelompok *Bcl-2* yang dapat menginduksi apoptosis seperti *Bax* (Holmstrom TH, 2000; Kaufmann, 2000)

Apabila terjadi kerusakan DNA misal karena pemberian kemoterapi, maka akan terjadi apoptosis melalui beberapa jalur yaitu : (a) p53 yang akan merangsang beberapa gen menginduksi apoptosis, yaitu gen *Bax* (merupakan gen yang responsif terhadap komando kematian sel oleh rangsangan p53); (b) terjadi stress oksidatif mengakibatkan jumlah ROS (*Reactive Oxygen Species*) meningkat, selanjutnya terjadi pelepasan *cytochrome-c*, dan akhirnya terjadi

apoptosis; (c) menginduksi ikatan *Fas-FasL* yang mengakibatkan induksi sinyal molekul *Fas Associated Death Domain (FADD)* dan *caspase-8* untuk mengaktifkan *Death Inducing Signaling Complex (DISC)* dan akhirnya memulai sinyal *cascade* apoptosis (Muller M, et al, 1998; Kim R, et al, 2001; Childs AC, et al, 2002).

Sementara pertumbuhan sel diatur oleh gen perangsang dan penghambat pertumbuhan maka kehidupan sel ditentukan oleh gen perangsang dan penghambat apoptosis. Gen penghambat apoptosis ialah gen *Bcl-2*. Peningkatan ekspresi *Bcl-2* mengakibatkan perpanjangan hidup sel dan jika sel mengalami kerusakan genetik maka terus terjadi mutasi tambahan pada onkogen dan anti onkogen. Yang meningkatkan apoptosis ialah gen *Bax*. Hubungan tingkat kapasitas kedua gen *Bcl-2* dan *Bax* menentukan jumlah sel.

Berbeda dengan nekrosis, morfologi apoptosis dalam jaringan cukup khas dan lebih jelas untuk diamati. Morfologi apoptosis yang tampak dengan mikroskop cahaya memakai pulasan *Hematoksin Eosin (HE)* yaitu sel tampak bulat sampai oval dengan ukuran lebih kecil dari sel normal, keberadaannya tunggal dan terpisah. Sitoplasma mengalami kondensasi sehingga tampak padat kemerahan. Kromatin inti mengalami kondensasi teratur dengan berbagai bentuk dan ukuran, ini menunjukkan gambaran khas dari apoptosis. Inti pecah menjadi dua fragmen atau lebih. Hasil pecahan inti dan sitoplasma biasanya berbentuk bulat dengan sitoplasma kondensasi, dapat disertai atau tanpa kromatin inti disebut dengan *apoptotic bodies* (Kotlan, 2005).

Apoptosis adalah suatu proses kematian sel yang terprogram, diatur secara genetik, bersifat aktif, ditandai dengan adanya kondensasi kromatin,

fragmentasi sel dan pagositosis sel tersebut oleh sel tetangganya. Kresno dalam tulisannya, apoptosis adalah kematian sel terprogram yang merupakan proses penting dalam pengaturan homeostasis normal, proses ini menghasilkan keseimbangan dalam jumlah sel jaringan tertentu melalui eliminasi sel yang rusak dan proliferasi fisiologis dan dengan demikian memelihara agar fungsi jaringan normal. Deregulasi apoptosis mengakibatkan keadaan patologis, termasuk proliferasi sel secara tidak terkontrol seperti dijumpai pada kanker. Ada berbagai bukti yang menyatakan kontrol apoptosis dikaitkan dengan gen yang mengatur berlangsungnya siklus sel, diantaranya gen p53, Rb, Myc, E1A dan keluarga Bcl-2. Gangguan regulasi dan proliferasi sel baik akibat aktivitas onkogen dominan maupun inaktivasi tumor supressor gen ada hubungannya dengan kontrol apoptosis. Dalam literatur lain menyebutkan apoptosis merupakan suatu bentuk kematian sel yang didesain untuk menghilangkan sel-sel *host* yang tidak diinginkan melalui aktivasi serangkaian peristiwa yang terprogram secara internal melalui serangkaian produk gen. Adapun terjadinya penyebab diatas sebagai berikut:

- a. Selama proses perkembangan
- b. Sebagai suatu mekanisme homeostatik untuk memelihara sel di jaringan.
- c. Sebagai suatu mekanisme pertahanan seperti reaksi imun
- d. Apabila sel-sel dihancurkan oleh penyakit atau agen yang berbahaya.
- e. Proses penuaan.

Faktor-faktor yang bertanggung jawab dari serangkaian peristiwa apoptosis baik fisiologis, adaptif maupun patologis adalah:

- a. Kerusakan sel yang terprogram selama embriogenesis termasuk implantasi, organogenesis, involusi perkembangan dan metamorfosis yang tidak selalu didefinisikan secara fungsional sebagai kematian sel yang terprogram.
- b. Proses involusi yang tergantung hormon pada orang dewasa seperti penurunan sel endometrium selama siklus menstruasi, atresia folikuler ovarium pada menopause, regresi payudara setelah menyapih dan atrofi prostat setelah katrasi.
- c. Kematian sel pada tumor paling sering selama regresi tapi juga pada tumor dengan pertumbuhan sel yang aktif.
- d. Kematian neutrofil selama respon respon inflamasi akut.
- e. Kematian sel-sel imun baik limfosit B dan limfosit T, setelah deflesi sitokin, seiring dengan delesi sel-sel T autoreaktif pada timus yang sedang berkembang.
- f. Kematian sel yang diinduksi oleh sel-sel T sitotoksik, seperti pada penolakan imun seluler.

DNA kromatin inti yang mengalami kondensasi dapat dideteksi dengan pulasan *Fuelgen* untuk DNA. Dengan teknik ini, DNA kromatin berwarna ungu tampak lebih gelap dibandingkan DNA sel – sel ganas sekitarnya. Bentuk kondensasi kromatinnya tampak lebih jelas dan sitoplasma sel apoptosis berwarna hijau muda dengan *counterstain light green* (Brancroft, 1982)

Menurut Contran, morfologi apoptosis yang tampak dengan menggunakan mikroskop elektron adalah :

1. Sel mengkerut, dengan ukuran sel lebih kecil, sitoplasma padat dan organelnya relatif normal tapi lebih padat.
2. Kondensasi kromatin, yang merupakan bentuk khas dari apoptosis dimana kromatin mengumpul perifer inti menjadi massa yang padat sehingga inti sel menjadi pecah membentuk dua fragmen atau lebih.
3. Pembentukan gelembung sel sitoplasma dan badan apoptotik dimana permukaan sel apoptosis mengalami penggelembungan yang diikuti oleh fragmen inti, organel yang memadat dengan atau tanpa fragmen inti.
4. Fagositosis sel apoptosis atau badan apoptosis oleh sel tetangganya atau makrofag dan kemudian segera didegradasi dalam lisosom.

Ciri biokimia yang terjadi pada sel apoptosis ialah pemecahan protein, *cross-linking* protein, fragmentasi DNA dan pengenalan oleh fagosit. Pada apoptosis akan terjadi hidrolisis protein yang melibatkan aktivasi *family protein cystein* yang disebut caspase. Dimana caspase akan memecah protein inti dan sitoskeleton. Fragmentasi DNA pada sel apoptosis menjadi 50 – 300 kilobase per fragmen, sehingga fragmentasi ini terjadi di *internukleosome* kemudian fragmen yang besar ini pecah lagi menjadi 180 – 200 basepair per fragmen.

Fragmentasi DNA dapat dikenali dengan elektroforesis gel agarosa atau dengan Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*) Assay. Sel yang terjadi apoptosis memperlihatkan

phosphatidyl serine pada lapisan luar membran plasma yang dapat dikenali oleh sel tetangga atau makrofag untuk dilakukan fagositosis.

Mekanisme apoptosis akibat jejas radiasi, radikal bebas adalah (1) agen penjejas akan mencederai DNA sehingga menimbulkan akumulasi p53 untuk meningkatkan regulasi gen sasaran yang lain yaitu p21 dan GADD 45 agar menahan siklus sel sehingga terjadi perbaikan kerusakan DNA. Jika sel gagal untuk memperbaiki kerusakan maka sel akan diapoptosis. (2) p53 mengaktifkan gen pro apoptosis sehingga akan mengaktifasi caspase. (3) caspase akan menimbulkan perubahan pada inti dan sitoskeleton dengan mengaktifasi endonuklease dan protease yang akan menyebabkan degradasi sitoskeleton dan protein inti sehingga terjadi fragmentasi kromatin inti, kerusakan sitoskeleton akan menimbulkan bentukan dari pengelembungan sitoplasma. (4) gembungan sitoplasma diikuti fragmen menjadi sejumlah badan apoptotik yang disusun oleh sitoplasma, organel dengan atau tanpa fragmen inti. (5) badan apoptotik akan difagositosis oleh sel tetangga atau makrofag.

Gangguan fungsi apoptosis menyebabkan gangguan mekanisme homeostasis untuk mengontrol populasi sel di jaringan dan akan menimbulkan gangguan proses eliminasi sel yang mengalami mutasi. Mutasi pada proto onkogen, gen supresor kanker dan gen apoptosis dapat menimbulkan karsinogenesis (Hansen, 2001).

2.7.3.1 Peranan Apoptosis

Pada sistem imun, apoptosis memiliki aturan fisiologi spesifik yang eksklusif untuk kebutuhan fungsi sistem tersebut. Sebagai contoh tanggung jawab untuk penghapusan sel-sel T autoreaktif dalam timus bertanggung jawab untuk batas toleransinya sendiri dan untuk seleksi sel-sel B dalam pusat germinal limfoid selama respon imun humoral.

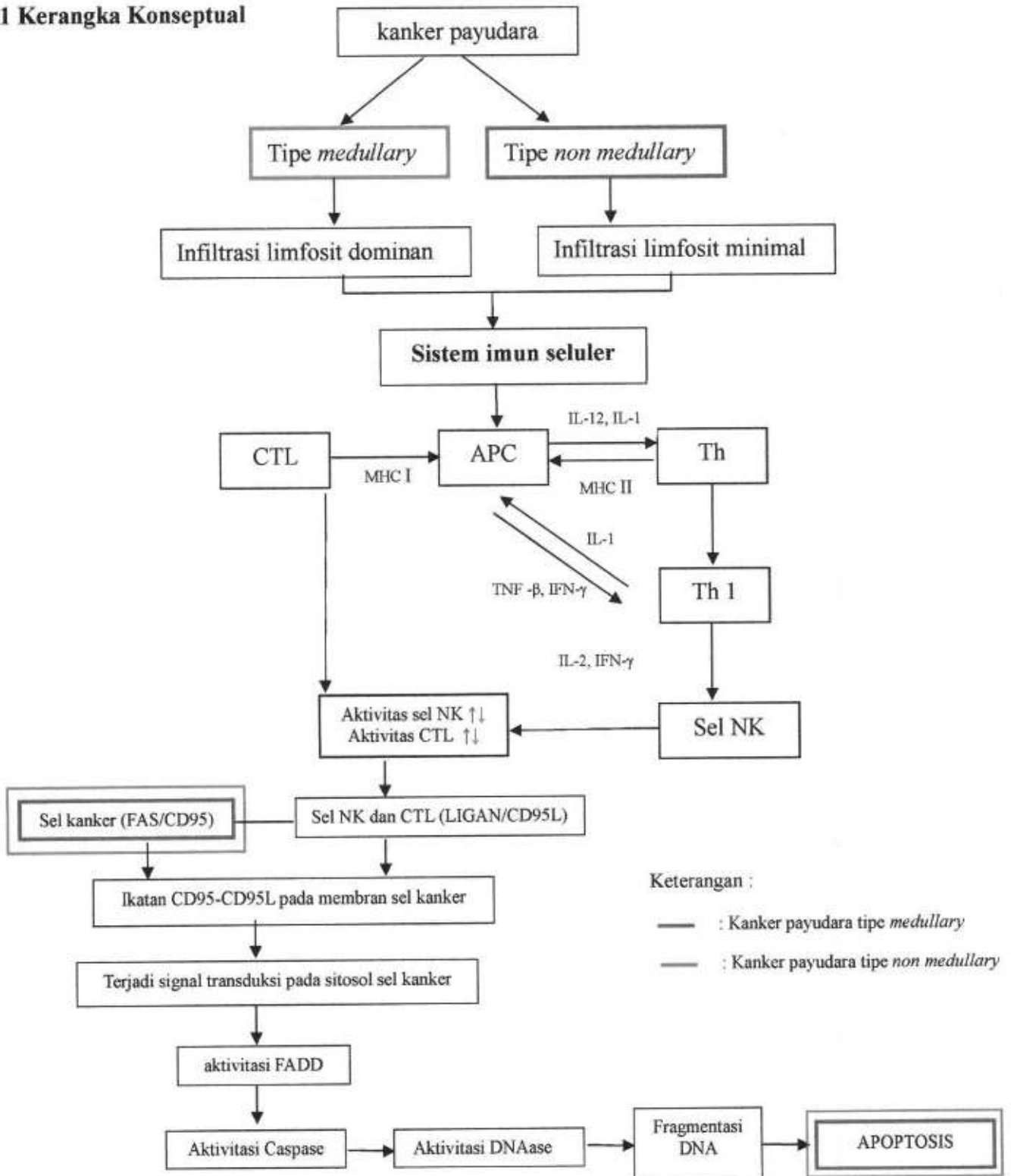
2.7.3.2. Induksi Apoptosis oleh Antibodi APO-1 atau Fas Antigen

Antigen APO-1 telah didefinisikan dari penelitian antibodi monoklonal yang meningkat pada sel limfoblast B manusia. Satu dari antibodi yang telah ditemukan menginduksi apoptosis yang diaktifkan imfosit B dan T manusia dan bermacam-macam sel dari derivat sel tumor limfoid manusia. Antigen membran sel dimana antibodi ini melekat diberi nama APO-1. Antigen FAS, didefinisikan sebagai suatu antibodi monoklonal kedua yang dikembangkan oleh kelompok kerja lain, telah menemukan identitas antigen APO-1. Molekul ini memiliki reseptor faktor nekrosis tumor manusia/reseptor faktor pertumbuhan syaraf yang merupakan famili dari protein permukaan sel. Injeksi anti – antibodi monoklonal APO-1 menyebabkan regresi yang cepat *murime xenograft* dari APO-1, ekspresi dari turunan sel limfoid manusia, dengan regresi yang didampingi oleh apoptosis meningkat cepat dari sel-sel yang didorong (O'Connel, 1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Kanker payudara tipe *medullary* mempunyai prognosis yang lebih baik daripada tipe kanker payudara lainnya. Perbedaan prognosis tersebut diduga dipengaruhi oleh infiltrasi limfosit yang terkait dengan respon imun seluler tubuh dalam pengendalian sel kanker. Sel kanker akan mengekspresikan *Fas* pada permukaan membran selnya, sedangkan sel NK (*Natural Killer Cell*) dan CTL (*Cytotoxic T - Lymphocyte*) mengekspresikan ligan (*FasL*). Ekspresi ligan pada permukaan sel NK atau CTL, serta adanya ekspresi *Fas* pada permukaan sel kanker mengakibatkan terjadinya ikatan *Fas - FasL*. Dengan adanya ikatan *Fas - FasL* pada permukaan sel kanker, maka pada sitosol sel kanker terjadi aktivitas FADD (*Fas Associated Protein Death Domain*) yang akan memicu aktivitas kaskade kaspase. Kemudian kaspase yang aktif menyebabkan aktivasi enzim DNAase untuk memfragmentasi DNA sel kanker sehingga sel tersebut mengalami kematian (apoptosis).

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Jumlah sel yang mengekspresikan CD95 lebih banyak pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan pada tipe *non medullary*.
2. Jumlah sel yang mengalami apoptosis lebih banyak pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan pada tipe *non medullary*.
3. Terdapat hubungan antara jumlah sel yang mengekspresikan CD95 dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

BAB 4

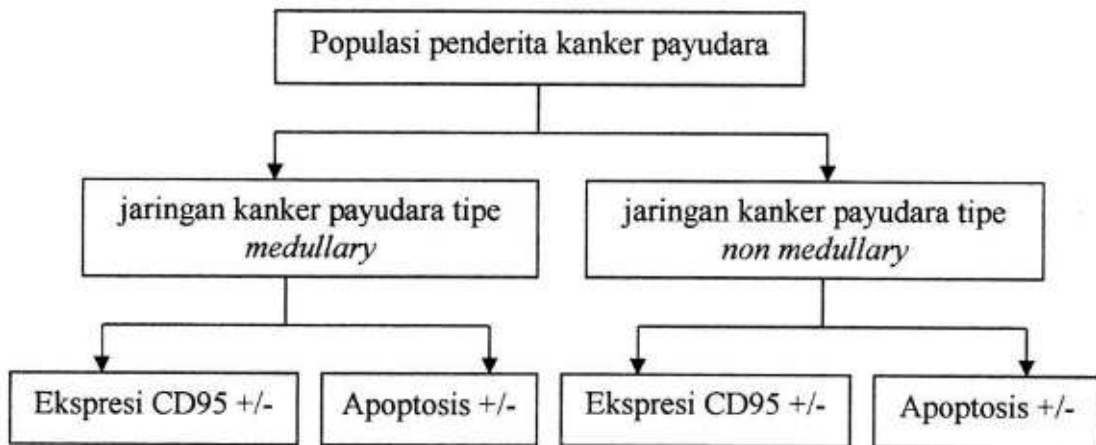
MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dimana pengumpulan data tanpa melakukan intervensi atau perlakuan pada subyek penelitian, yang kemudian dilakukan analisis hasil antar variabel – variabel yang diteliti. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional* dengan cara pendekatan, observasi atau pengumpulan data sekaligus pada suatu saat (*point time approach*). Sehingga tiap subyek penelitian hanya diobservasi sekali saja dan pengukuran dilakukan terhadap status variabel subyek pada saat penelitian. Subyek penelitian adalah penderita kanker payudara, dan sebagai obyek penelitian adalah sel jaringan tumor dari penderita kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*. Sampel yang digunakan memiliki kriteria inklusi yang meliputi jenis kelamin, tipe kanker, infiltrasi limfosit pada sel kanker, dan *grade* kanker. Penelitian ini dimaksudkan untuk melihat jumlah sel pengekspresi CD95, jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan dengan pada payudara tipe *non medullary*. Hal ini dimaksudkan untuk menjelaskan respon imun seluler berperan dalam pengendalian kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*. Dilakukan pemeriksaan Imunohistokimia untuk mengetahui jumlah sel yang mengekspresikan CD95, dan pemeriksaan TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labeling*) Assay untuk mengetahui jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan *cross sectional* dengan dua populasi dimana variabel dari masing – masing populasi diobservasi sekaligus pada waktu yang sama. Oleh sebab itu rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1. Rancangan Penelitian

Penderita kanker payudara di RS. Onkologi Surabaya dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kelompok penderita kanker payudara tipe *medullary* dan kelompok penderita kanker payudara tipe *non medullary*. Masing – masing kelompok diamati jumlah sel yang mengekspresikan CD95 dengan pemeriksaan Immunohistokimia, sedangkan sel yang mengalami apoptosis diamati dengan TUNEL Assay.

4.3 Populasi, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.3.1 Populasi adalah semua penderita yang secara klinis dan histopatologis menunjukkan gambaran kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary* yang datang berobat ke Rumah Sakit Onkologi Surabaya pada periode tahun 2005 – 2009.

4.3.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan untuk penelitian ini diambil dari semua sampel jaringan kanker payudara hasil operasi penderita yang menunjukkan gambaran histopatologis karsinoma tipe *medullary* dan *non medullary* yang diperiksa di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Onkologi Surabaya pada periode tahun 2005 – 2009. Berdasarkan Lwanga dan Lemenshow (1991) besar sampel dapat ditentukan dengan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 n &= \frac{2 (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}) \cdot \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \\
 &= \frac{2 (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}) \cdot (10.1)^2}{(50.2 - 38.1)^2} \\
 &= \frac{2 (1,96 + 1,28) \cdot (10.1)^2}{(50.2 - 38.1)^2} \\
 &= \frac{2 (3,24) (102.01)}{(146,41)} \\
 &= 14.51 \approx 15
 \end{aligned}$$

dimana,

n = besar sampel

α = *level of significance*

β = *power of test*

$Z_{1-\alpha/2}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan tingkat kemaknaan (untuk $\alpha = 0,05$ adalah 1,96)

$Z_{1-\beta}$ = nilai pada distribusi normal standar yang sama dengan kuasa (*power*) sebesar diinginkan (untuk $\beta = 0,10$ adalah 1,28)

μ_1 = rata – rata kelompok kanker payudara tipe *medullary* = 50,2
(berdasarkan penelitian Muschen, 1999)

μ_2 = rata – rata kelompok kanker payudara tipe *non medullary* = 38,1
(berdasarkan penelitian Muschen, 1999)

σ = standar deviasi = 10,1 (berdasarkan penelitian Muschen, 1999)

Sehingga, sampel yang digunakan untuk penelitian ini sebanyak 15 jaringan kanker payudara dari penderita kanker payudara tipe *medullary* dan 15 jaringan kanker payudara dari penderita kanker payudara tipe *non medullary*.

4.3.3 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik pengambilan sampel secara acak sederhana (*simple random sampling*) berdasarkan kriteria inklusi yaitu jenis kelamin, tipe kanker, infiltrasi limfosit pada sel kanker, dan *grade* kanker, dimana setiap unit dari populasi mempunyai kesempatan yang sama untuk diseleksi sebagai sampel.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini yaitu kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*, sel yang mengekspresikan CD95, dan sel yang mengalami apoptosis.

4.4.2 Definisi Operasional

4.4.2.1 Kanker payudara tipe *medullary* adalah tumor karsinoma dengan batas tegas, terdiri atas sel yang berdiferensiasi buruk, tanpa struktur

glandular, sedikit stroma, dan infiltrasi limfoplasmasitik yang dominan. Ditentukan dengan pemeriksaan histopatologis menggunakan mikroskop cahaya dan dilakukan oleh ahli Patologi dari Rumah Sakit Onkologi Surabaya dan sebagai *second observer/reviewer* adalah ahli Patologi dari Departemen Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – SMF Patologi RSUD. Dr. Soetomo Surabaya.

4.4.2.2 Kanker payudara tipe *non medullary* adalah kanker payudara tipe duktal/*infiltrating ductal carcinoma (no other specified) grade III* dengan gambaran histologis sel tumor tersusun dalam kelompok, batang, atau struktur mirip kelenjar, stroma prominen di bagian sentral, jaringan elastis di sekitar duktus. Derajat diferensiasi buruk yang tersusun atas kelompok sel pleiomorfik disertai jumlah mitosis yang banyak. Ditentukan dengan pemeriksaan histopatologis menggunakan mikroskop cahaya dan dilakukan oleh ahli Patologi dari Rumah Sakit Onkologi Surabaya dan sebagai *second observer/reviewer* adalah ahli Patologi dari Departemen Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – SMF Patologi RSUD. Dr. Soetomo Surabaya.

4.4.2.3 Sel yang mengekspresikan CD95 adalah penilaian jumlah sel yang mengekspresikan ligan diperiksa dengan teknik imunohistokimia dengan menggunakan *antibody monoclonal CD95/Fas Ab-3* (produk Thermo Scientific nomor catalog MS-1098-S). Perhitungan dilakukan secara visual dengan memakai mikroskop cahaya pembesaran 400X, warna coklat nyata pada membran sel menunjukkan gambaran ekspresi ligan pada permukaan sel pengeksresi CD95. Skor ekspresi dihitung dari

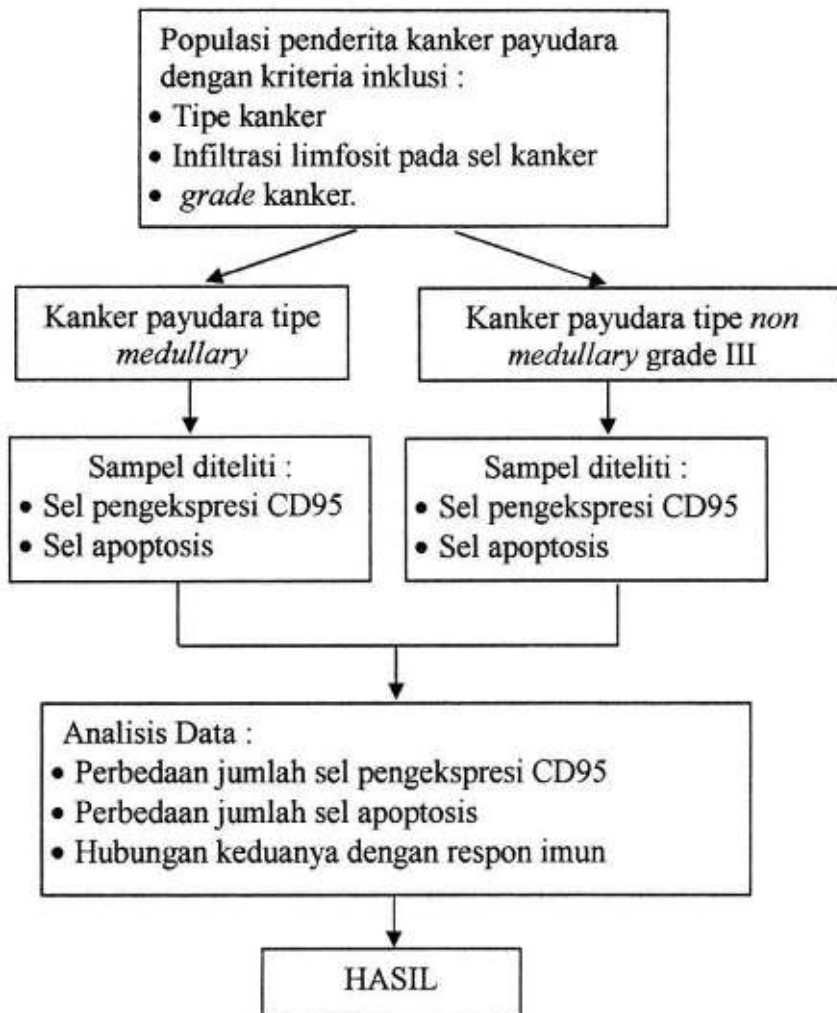
persentase sel positif terwarnai per sepuluh satuan lapang pandang terhadap seluruh sel kanker payudara.

- 4.4.2.4 Sel yang mengalami apoptosis adalah penilaian jumlah sel yang dicirikan dengan adanya fragmentasi DNA yang diperiksa dengan teknik TUNEL *assay* dengan menggunakan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Pengamatan dan perhitungan persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan mikroskop cahaya per sepuluh satuan lapang pandang. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna coklat, sedangkan sel yang lain akan menyerap warna hijau sesuai dengan *counterstain* yang digunakan yaitu *methyl green*.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

- 4.5.1 Sampel penelitian berupa jaringan tumor hasil operasi mastektomi diperoleh dari penderita kanker payudara yang datang berobat ke Rumah Sakit Onkologi Surabaya selama periode tahun 2005 – 2009.
- 4.5.2 Penelitian diagnostik, ukuran, diferensiasi sel, dan progresifitas tumor dari pulasan Hematoksilin Eosin dan pemeriksaan sel pengeksresi CD95 dengan pulasan imunohistokimia dilakukan di unit Laboratorium Patologi Anatomi RS Onkologi Surabaya. Sedangkan untuk pemeriksaan sel yang mengalami apoptosis, menggunakan teknik pemeriksaan TUNEL *assay* yang dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Airlangga.

4.6 Kerangka Operasional



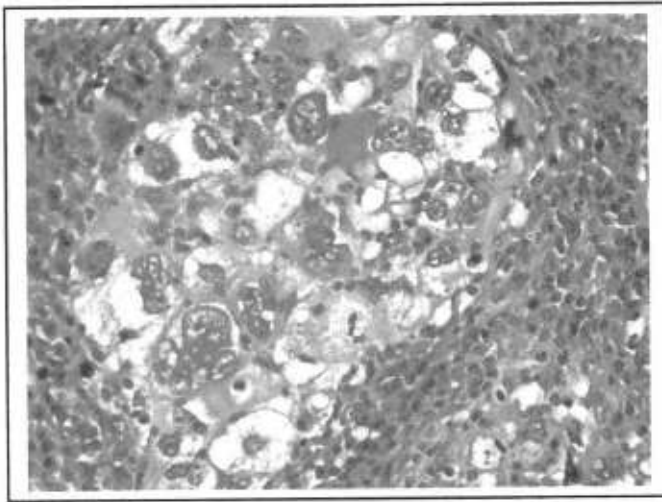
Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian

4.7 Rancangan Analisis Data

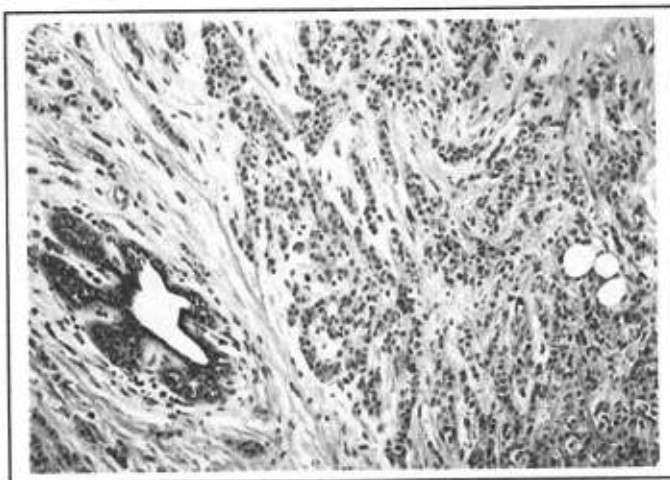
Data hasil penelitian dianalisis dengan statistik deskriptif untuk mengetahui gambaran karakteristik variabel, uji homogenitas untuk mengetahui variansi antar kelompok, uji normalitas distribusi untuk mengetahui data yang diperoleh berasal dari populasi normal. Uji T untuk mengetahui beda antar variabel penelitian dengan tingkat kemaknaan 0.05%.

BAB 5**ANALISIS HASIL PENELITIAN****5.1 Data Penelitian**

Hasil pengumpulan sampel yang diperoleh berdasarkan laporan hasil pemeriksaan histopatologi di unit laboratorium patologi anatomi RS. Onkologi Surabaya, dengan dasar kriteria inklusi yang telah ditetapkan dan perhitungan besar sampel, diperoleh sebanyak 20 sampel untuk diteliti.

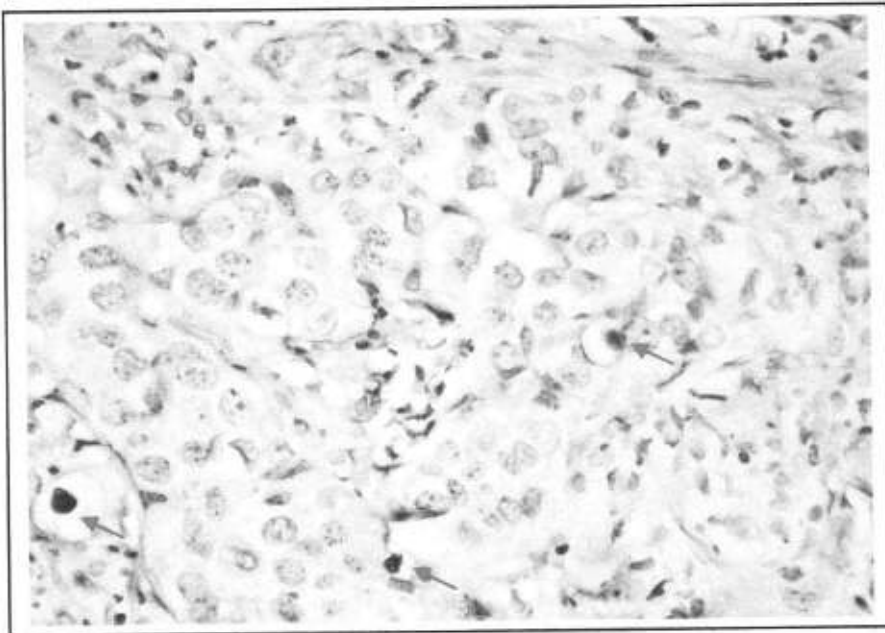


Gambar 5.1 Gambaran histopatologi kanker payudara tipe *medullary* dengan pewarnaan HE, pembesaran 100X.

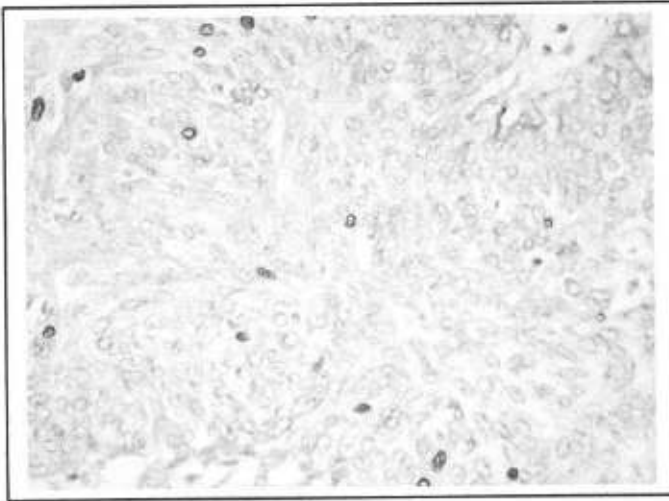


Gambar 5.2 Gambaran histopatologi kanker payudara tipe *non medullary* (*infiltrating ductal carcinoma no other specified grade III*) dengan pewarnaan HE, pembesaran 100X

Pemeriksaan terhadap jumlah sel kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary* yang mengalami apoptosis setelah pengecatan TUNEL assay menggunakan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* dilakukan dengan cara mengamati dan menghitung sel apoptosis per sepuluh lapang pandang dengan pembesaran 400X pada mikroskop Olympus tipe CX41. Berdasarkan Lipponen *et al* (1994), *apoptotic index* (AI) dihitung dari jumlah sel apoptosis tiap milimeter kuadrat dari jaringan kanker yang diamati atau persentase jumlah sel kanker yang mengalami apoptosis. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna coklat, sedangkan sel yang lain akan menyerap warna hijau sesuai dengan *counterstain* yang digunakan yaitu *methyl green*.

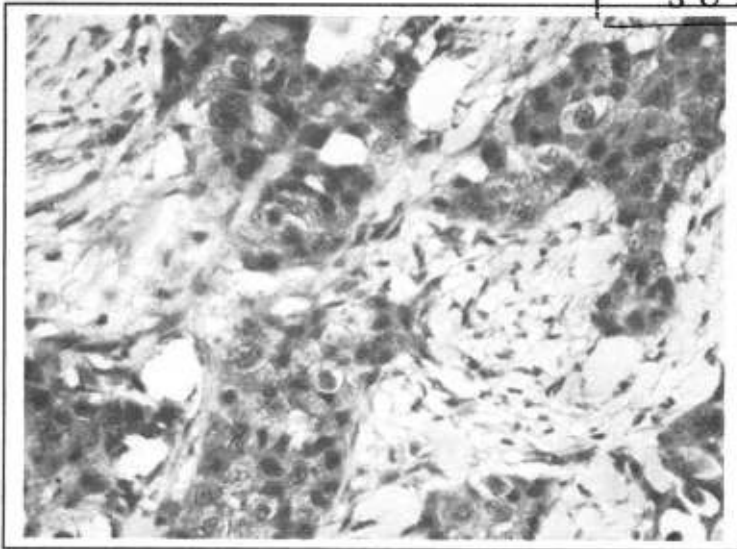


Gambar 5.3 Gambaran apoptosis positif pada kanker payudara tipe *medullary*, pembesaran 400X. Keterangan gambar tanda panah berwarna merah, sel yang mengalami apoptosis dengan pewarnaan TUNEL assay.

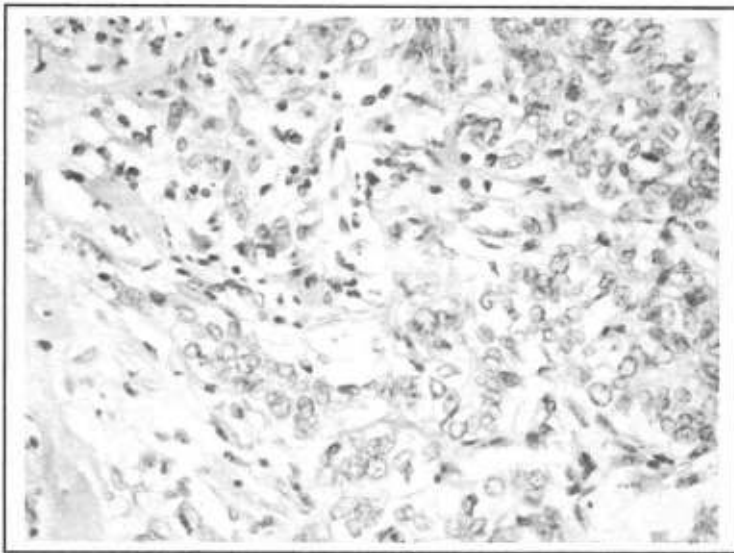


Gambar 5.4 Gambaran apoptosis negatif pada kanker payudara tipe *non medullary*, pembesaran 400X

Pemeriksaan terhadap jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary* dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan *antibody monoclonal* CD95/Fas Ab-3. Penghitungan jumlah sel pengeksresi CD95 dilakukan secara visual dengan memakai mikroskop cahaya pembesaran 400X, warna coklat nyata pada membran sel menunjukkan gambaran ekspresi ligan pada permukaan sel pengeksresi CD95. Skor ekspresi dihitung dari persentase sel positif terwarnai per sepuluh satuan lapang pandang terhadap seluruh sel kanker payudara.



Gambar 5.5 Gambaran ekspresi CD95 positif pada kanker payudara tipe *medullary*, pembesaran 400X. Keterangan gambar warna coklat, sel yang positif mengekspresikan CD95 dengan pewarnaan immunohistokimia



Gambar 5.6 Gambaran ekspresi CD95 negatif pada kanker payudara tipe *non medullary*, pembesaran 400X

Analisis deskriptif dari data yang diperoleh menunjukkan rerata dan simpangan baku data persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* adalah $60,05 \pm 27,23$. Rerata dan simpangan baku data persentase jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* adalah $57,00 \pm 24,30$ (lampiran 5). Kanker payudara tipe *non medullary*, nilai rerata dan simpangan baku data persentase jumlah sel yang

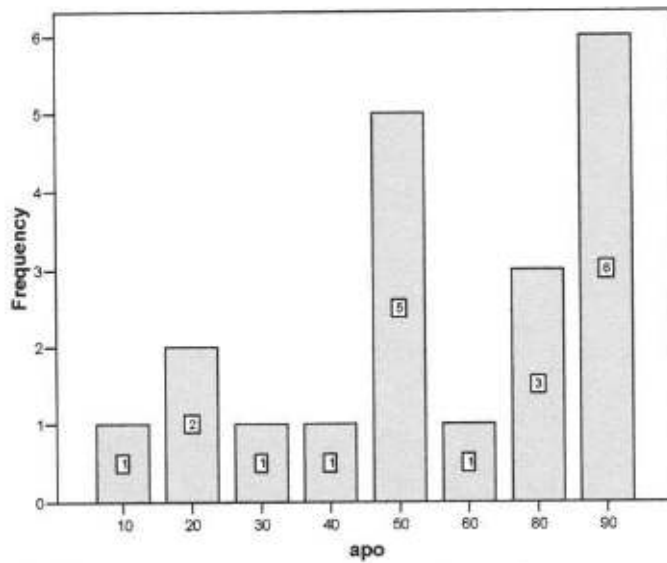
mengalami apoptosis adalah $41,50 \pm 25,39$. Sedangkan rerata dan simpangan baku data persentase jumlah sel pengeksresi CD95 $42,00 \pm 21,42$ (lampiran 6).

Tabel 5.1 Rerata dan simpangan baku data pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*

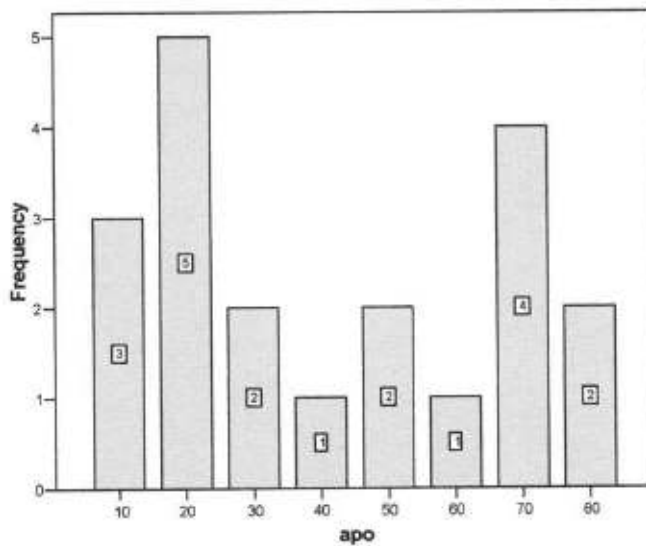
Tipe Kanker/Variabel	Medullary		Non Medullary	
	CD95	Apoptosis	CD95	Apoptosis
Mean \pm SD	57,00 \pm 24,30	60,50 \pm 27,23	42,00 \pm 21,42	41,50 \pm 25,39
Uji Normalitas (p > 0.05)	0,324	0,732	0,392	0,429

Berdasarkan analisis deskriptif, didapatkan usia penderita kanker payudara tipe *medullary* bervariasi antara 39 tahun sampai 82 tahun dengan rerata 55 tahun. Kasus kanker payudara tipe *medullary* terbanyak 15% terjadi pada kelompok usia 39 tahun. Sedangkan penderita kanker payudara tipe *non medullary* bervariasi antara 37 tahun sampai 73 tahun dengan rerata 54 tahun. Kasus kanker payudara tipe *non medullary* terbanyak 20% terjadi pada kelompok usia 53 tahun.

Frekuensi jumlah sel yang mengalami apoptosis tertinggi 90% ditemukan pada 6 kasus atau 30% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *medullary*. Frekuensi jumlah sel yang mengalami apoptosis terendah ditemukan satu kasus atau 5% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *medullary* (gambar 5.7). Sedangkan frekuensi jumlah sel yang mengalami apoptosis tertinggi 80% ditemukan pada 6 kasus atau 30% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *non medullary*. Frekuensi jumlah sel yang mengalami apoptosis terendah ditemukan satu kasus atau 5% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *non medullary*.



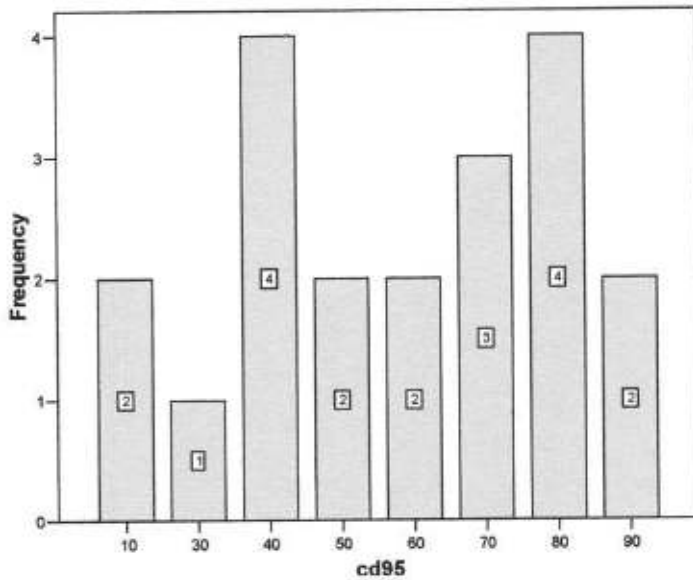
Gambar 5.7 Diagram batang persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary*



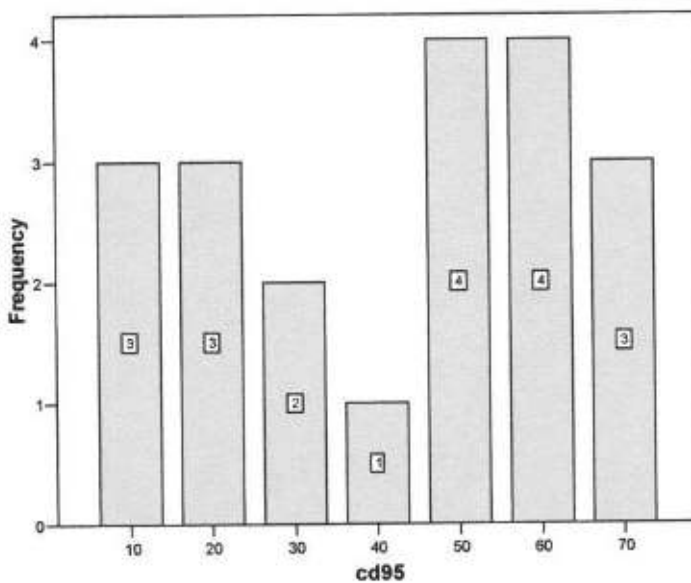
Gambar 5.8 Diagram batang persentase jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*

Frekuensi jumlah sel pengeksresi CD95 tertinggi 70% ditemukan pada 6 kasus atau 30% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *medullary*. Frekuensi jumlah sel pengeksresi CD95 terendah 30% ditemukan 1 kasus atau 5% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *medullary*. Sedangkan frekuensi jumlah sel pengeksresi CD95 tertinggi 60% ditemukan pada 5 kasus atau 25% dari total 20

kasus kanker payudara tipe *non medullary*. Frekuensi jumlah sel pengeksresi CD95 terendah ditemukan satu kasus atau 5% dari total 20 kasus kanker payudara tipe *non medullary*.



Gambar 5.9 Diagram batang frekuensi persentase jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary*



Gambar 5.10 Diagram batang frekuensi persentase jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*.

Berdasarkan laporan hasil pemeriksaan imunohistokimia untuk reseptor estrogen di unit laboratorium patologi anatomi RS. Onkologi Surabaya periode tahun 2005 – 2009 diperoleh 80% atau sebanyak 16 dari 20 kasus kanker payudara tipe *medullary* memiliki status reseptor estrogen negatif. Sedangkan untuk kanker payudara tipe *non medullary* diperoleh sebanyak 11 kasus atau 55% dari 20 kasus yang memiliki status reseptor estrogen negatif (lampiran 12 dan lampiran 13).

5.2.1. Hasil Uji Normalitas

Uji normalitas yang dikembangkan *Kolmogorov – Smirnov* untuk pengujian hipotesis mengenai distribusi normal dengan parameter yang telah ditentukan. Pengujian dengan menggunakan statistik parametrik mensyaratkan data yang berdistribusi normal, sehingga dilakukan uji normalitas terhadap rerata jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel pengeksresi CD95, baik pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Nilai signifikansi (p) uji normalitas sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dengan menggunakan *one sample Kolmogorov – Smirnov test* adalah 0,324 dan nilai p untuk sel pengeksresi CD95 adalah 0,732 (lampiran 5).

Pada kanker payudara tipe *non medullary*, nilai signifikansi (p) uji normalitas sel yang mengalami apoptosis adalah 0,392 dan nilai p untuk sel pengeksresi CD95 adalah 0,429 (lampiran 6). Syarat data berdistribusi normal bila nilai $p > 0,05$, hal ini menunjukkan bahwa seluruh variabel penelitian yang diuji memiliki distribusi normal.

2.2 Hasil Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk menentukan sampel berasal dari varians yang homogen. Uji homogenitas dilakukan dengan *Levene's test* yang berpedoman pada nilai signifikansi (p). Berdasarkan hasil *Levene's test* nilai p ($0,805$) $> 0,05$ menunjukkan bahwa data jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary* adalah homogen. Perhitungan lengkap dari uji homogenitas dapat diperhatikan pada lampiran 9. Begitu pula untuk data jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*, dengan nilai p ($0,670$) $> 0,05$ yang menunjukkan bahwa kedua data tersebut homogen (lampiran 10).

Uji komparasi antara pengamat 1 dan pengamat 2 untuk menentukan homogenitas data pengamatan jumlah sel yang mengalami apoptosis yang diperoleh dari kedua pengamat tersebut, dengan nilai p ($0,805$) $> 0,05$. Uji komparasi antara pengamat 1 dan pengamat 2 untuk menentukan homogenitas data pengamatan jumlah sel pengeksresi CD95 yang diperoleh dari kedua pengamat tersebut, dengan nilai p ($0,670$) $> 0,05$.

5.2.3 Hasil Uji Beda Variabel Jumlah Sel Apoptosis

Uji beda variabel yang digunakan adalah *independent sample t-test* untuk membuktikan hipotesis penelitian bahwa terdapat perbedaan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Karena data dari variabel penelitian homogen, maka dari lajur *equal variances assumed* diperoleh nilai t ($2,282$) dengan df 38 dimana nilai p ($0,028$) $< 0,05$. Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan jumlah sel apoptosis yang signifikan pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Dengan

nilai t (2,282) menunjukkan bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*. Berdasarkan analisis deskriptif juga didapat bahwa rerata jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak sebesar $60,50 \pm 27,23$, bila dibandingkan jumlah sel apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary* yaitu $41,50 \pm 25,39$.

5.2.4 Hasil Uji Beda Variabel Jumlah Sel Pengeksresi CD95

Uji beda variabel yang digunakan adalah *independent sample t-test* untuk membuktikan hipotesis penelitian bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Karena data dari variabel penelitian homogen, maka dari lajur *equal variances assumed* diperoleh nilai t (2,071) dengan df 38 dimana nilai p ($0,045$) $< 0,05$. Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 yang signifikan pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Dengan nilai t (2.071) menunjukkan bahwa jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*. Berdasarkan analisis deskriptif juga didapat bahwa rerata jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak sebesar $57,00 \pm 24,30$, bila dibandingkan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary* yaitu $42,00 \pm 21,42$.

5.2.5 Hasil Uji Korelasi Apoptosis dan Sel Pengeksresi CD95

Berdasarkan uji statistik *Pearson correlation*, korelasi antara variabel jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* menunjukkan derajat hubungan yang tinggi, yaitu

sebesar 0,877 (lampiran 9). Kenaikan jumlah sel pengeksresi CD95 akan diikuti oleh kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis, yang ditunjukkan dengan nilai koefisien positif. Ditunjukkan oleh tabel statistik di bawah ini :

Tabel 5.2 Tabel uji korelasi Apoptosis – CD 95 pada kanker payudara tipe *Medullary*

Correlations between apoptosis vs CD95 in Medullary

		APO	CD95
APO	Pearson Correlation	1	.877(**)
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	20	20
CD95	Pearson Correlation	.877(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Pada kanker payudara tipe *non medullary* juga terdapat korelasi yang positif. Korelasi antara variabel jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel pengeksresi CD95, yaitu 0,816 (lampiran 10). Ditunjukkan oleh tabel statistik di bawah ini :

Tabel 5.3 Tabel uji korelasi Apoptosis – CD 95 pada kanker payudara tipe *Non Medullary*

Correlations between apoptosis vs CD95 in Non Medullary

		APO	CD95
APO	Pearson Correlation	1	.816(**)
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	20	20
CD95	Pearson Correlation	.816(**)	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

5.2.6 Hasil Uji Korelasi Apoptosis dan Sel Pengekspresi CD95 pada Kanker Payudara Tipe *Medullary* dan *Non Medullary*

Uji statistik *Pearson correlation* menunjukkan korelasi antara variabel jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel pengekspresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary* sebesar 0,552 dengan nilai rerata jumlah sel apoptosis $51,00 \pm 27,71$, dan nilai rerata jumlah sel pengekspresi CD95 $49,50 \pm 23,85$. Dapat diartikan bahwa kenaikan jumlah sel pengekspresi CD95 akan diikuti oleh kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis, baik pada kanker payudara tipe *medullary* maupun pada tipe *non medullary* (lampiran 11).

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Metode Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengekspresi CD95 dan jumlah sel yang mengalami apoptosis, serta terdapat hubungan antara jumlah sel pengekspresi CD95 dan jumlah sel yang mengalami apoptosis, baik pada kanker payudara tipe *medullary* dibandingkan dengan tipe *non medullary*. Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dimana pengumpulan data tanpa melakukan intervensi atau perlakuan pada subyek penelitian, yang kemudian dilakukan analisis hasil antar variabel yang diteliti. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *cross sectional* dengan cara pendekatan, observasi atau pengumpulan data sekaligus pada suatu saat (*point time approach*). Sehingga tiap subyek penelitian hanya diobservasi sekali saja dan pengukuran dilakukan terhadap status variabel subyek pada saat penelitian.

Rancangan penelitian ini menggunakan *cross sectional* dengan dua populasi yaitu populasi jaringan kanker payudara tipe *medullary* dan populasi jaringan kanker payudara tipe *non medullary*, dimana variabel dari masing – masing populasi diobservasi sekaligus pada waktu yang sama.

6.1.1 Unit Eksperimen

Unit eksperimen yang digunakan pada penelitian ini adalah jaringan kanker payudara yang diperiksa di Laboratorium Patologi Anatomi RS. Onkologi Surabaya, terkumpul selama periode tahun 2005 – 2009. Jaringan kanker

payudara yang digunakan dikategorikan ke dalam dua tipe kanker, yaitu kanker payudara tipe *medullary* dan kanker payudara tipe *non medullary*. Pemilihan jenis kanker tersebut berdasarkan fakta dari National Institute Data pada tahun 2007, dinyatakan bahwa kanker payudara tipe *medullary* merupakan salah satu tipe kanker payudara dengan prognosis paling baik, bila dibandingkan dengan tipe infiltrating duktal karsinoma lain yang dalam penelitian ini dikategorikan sebagai tipe *non medullary*.

Kanker payudara tipe *medullary* merupakan salah satu sub tipe dari kanker payudara *infiltrating ductal carcinoma* yang unik dimana karakteristiknya dicirikan dengan infiltrasi limfosit yang dominan, sel-sel yang berdiferensiasi buruk tersusun pada lembaran-lembaran besar, dengan tidak dijumpai struktur kelenjar, dan stroma yang sedikit. Secara makroskopis berbentuk bulat dengan ukuran yang berbeda-beda, dengan diameter 2 – 3 cm, dengan batas yang tegas dan konsistensi lunak. Berwarna coklat sampai abu-abu. Sering dijumpai daerah nekrosis dan perdarahan. Dikatakan unik karena perilaku klinis kanker jenis ini tidak sesuai dengan gambaran histologinya yang berdiferensiasi buruk disertai proliferasi sel yang tinggi, sehingga dalam penentuan diagnosa kanker payudara tipe *medullary* tidak menggunakan sistem *grading* seperti pada tipe kanker payudara yang lain (Tavassoli, 1999). Kanker payudara tipe *medullary* ditandai dengan infiltrasi sejumlah besar *granzyme B* yang mengaktivasi *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL). CTL akan merusak sel tumor dengan menginduksi apoptosis melalui dua jalur, yaitu melalui pelepasan granula sitotoksik seperti perforin dan *granzyme B*, atau melalui interaksi antara ikatan Fas (CD95/APO-1) – Fas ligan (CD95L). (Yakirevich, 2000)

Kanker payudara tipe *non medullary*, dalam penelitian ini digunakan tipe *infiltrating ductal carcinoma (not otherwise specified) grade III*. Merupakan jenis yang paling banyak ditemukan dan mencapai 80% dari seluruh kasus kanker payudara. Kebanyakan tumor berkembang dari sel-sel epitel yang terdapat pada permukaan duktus. Secara makroskopis tumor berupa massa infiltratif berwarna putih-keabuan yang teraba keras seperti batu dan berpasir. Gurat kapur putih kekuningan merupakan ciri khas karsinoma ini dan dapat terjadi akibat deposit jaringan elastik (*elastosis*) di sekitar duktus di daerah yang terkena. Fibrosis dapat luas (*desmoplasia*) dan menghasilkan suatu karsinoma tipe keras (*scirrhous*). (Underwood, 1999).

Gambaran morfologi sel tumor dapat tersusun seperti ikatan, berkelompok dengan trabekula dimana beberapa tumor besar padat dan menginvasi sedikit stroma. Diferensiasi kelenjar dapat menunjukkan bentuk tubular dengan sentral luminal pada kelompok - kelompok sel tumor. (Underwood, 1999).

Sel kanker dapat dikelompokkan sesuai dengan derajat diferensiasinya. Penentuan derajat (*grading*) perubahan morfologi pada kanker payudara tipe duktal infiltratif NOS (*not otherwise spesified*) khususnya gambaran mikroskopik, ditentukan dengan sistem *Nottingham modification of the Bloom-Richardson* (NBR), dengan menilai persentase gambaran tubuler (*tubular formation*), pleomorfisme inti (*nuclear pleomorphism*) dan jumlah mitosis (*mitotic count*). Diferensiasi dibedakan menjadi tiga, yaitu diferensiasi baik (*grade I*), diferensiasi sedang atau moderat (*grade II*), dan diferensiasi buruk (*grade III*). Suatu *grade* kanker payudara ditentukan berdasarkan bentuk dan perilaku sel kanker

dibandingkan dengan sel normal. (Kumar, 2007). Dipilih jenis kanker duktal karsinoma *grade* III, yang berarti sel tumor berdiferensiasi buruk. Bila dikaitkan dengan prognosis, bahwa kanker payudara tipe duktal karsinoma invasif (*not otherwise specified*) *grade* III memiliki prognosis yang lebih buruk dengan tingkat ketahanan hidup hanya sekitar 20% selama 5 tahun dibandingkan prognosis penderita kanker payudara tipe *medullary* (Bertucci, 2006).

Fragmentasi merupakan salah satu ciri dari apoptosis (Contran, 1999), fragmentasi DNA pada apoptosis dapat dideteksi dengan TUNEL *assay* yang merupakan dasar teknik *apoptag detection kit*. Prinsip dari TUNEL *assay* ini adalah menyambung terminal 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang telah dilabel secara acak dengan digoxigenin. Reaksi penyambungan trifosfat nukleotida dengan ujung 3-OH dari fragmen DNA ini dikatalisis oleh enzim Tdt (*Terminal Deoxynukleotidyl Transferase*). Pelabelan nukleotida secara acak dimaksudkan untuk memicu ikatan antara digoxigenin - anti digoxigenin secara optimal. Prinsip TUNEL *assay* selengkapnya disajikan pada lampiran 4.

Pewarnaan dengan *apoptag detection kit* menggunakan enzim Tdt dan nukleotida yang dilabel digoxigenin menyebabkan ikatan antara ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan trifosfat nukleotida yang dilabel digoxigenin dan ikatan antara digoxigenin dengan anti digoxigenin peroksidase sehingga dengan penambahan substrat kromogenin akan menyebabkan sel yang *conjugate*, mempunyai ujung 3-OH dari fragmen DNA akan berwarna kecoklatan dan sel yang lain akan berwarna hijau. Warna kecoklatan ini terjadi karena ikatan antara ujung 3-OH dari fragmen DNA dengan nukleotida yang dilabel digoxigenin,

ikatan digoxigenin dengan anti digoxigenin peroksidase *conjugate*, dan ikatan antara peroksidase dengan DAB substrat.

6.1.2 Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini yaitu kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*, sel yang mengekspresikan CD95, dan sel yang mengalami apoptosis. Merupakan penelitian observasional analitik dimana pengumpulan data tanpa melakukan intervensi atau perlakuan pada subyek penelitian, tiap subyek penelitian hanya diobservasi sekali saja dan pengukuran dilakukan terhadap status variabel subyek pada saat penelitian. Subyek penelitian adalah penderita kanker payudara, dan sebagai obyek penelitian adalah sel jaringan tumor dari penderita kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*.

6.1.3 Analisis Data Statistik

Data jumlah sel yang mengalami apoptosis dan data jumlah sel pengeksresi CD95 disajikan sebagai data rasio, dengan variabel jenis kanker berupa data interval, jenis kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*. Oleh karena itu digunakan uji t, statistik parametrik, dimana data berdistribusi secara normal dan homogen.

Uji beda variabel untuk membuktikan hipotesis penelitian bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*, digunakan *independent sample t-test*, karena sampel yang didapat dari data berasal dari dua subyek yang berbeda.

Uji korelasi pada data jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel pengeksresi CD95 menggunakan *Pearson correlation*. Koefisien ini dilambangkan dengan huruf r , yang menyatakan hubungan keeratan antar variabel. Koefisien korelasi Pearson digunakan untuk mengestimasi korelasi dari data yang berjenis interval atau rasio. Korelasi Pearson menunjukkan adanya kekuatan hubungan linier dalam dua variabel. Koefisien korelasi menunjukkan kekuatan (*strength*) hubungan linear dan arah hubungan dua variabel acak. Jika koefisien korelasi positif, maka kedua variabel mempunyai hubungan searah.

6.2 Pembahasan Hasil Penelitian

6.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas digunakan untuk mengetahui data empirik yang diperoleh dari hasil penelitian sesuai dengan distribusi teoritik tertentu sehingga dapat dipakai dalam statistik parametrik (statistik inferensial), dimana hasil penelitian nantinya dapat digeneralisasikan dalam populasi. Uji normalitas dilakukan terhadap data jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*.

Data pengamatan yang digunakan untuk uji statistik berasal dari pengamatan dan perhitungan satu pengamat saja karena berdasarkan uji komparasi antara pengamat 1 dan pengamat 2. Membuktikan bahwa tidak ada beda yang signifikan terhadap data pengamatan yang diperoleh dari kedua pengamat tersebut, dengan nilai $p > 0.05$.

Hasil *one sample Kolmogorov – Smirnov Test* pada data jumlah sel apoptosis dan jumlah sel pengeksresi CD95 dengan nilai $p > 0.05$, hal ini

menunjukkan bahwa seluruh variabel penelitian yang diuji memiliki distribusi normal, sehingga persyaratan uji statistik parametrik telah terpenuhi.

6.2.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk menentukan sampel berasal dari varians yang homogen. Uji homogenitas dilakukan dengan *Levene's test* yang berpedoman pada nilai signifikansi (p). Berdasarkan hasil *Levene's test* nilai probabilitas $p > 0.05$ menunjukkan bahwa data jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary* adalah homogen.

6.2.3 Uji Beda

Uji beda variabel yang digunakan adalah *independent sample t-test* untuk membuktikan hipotesis penelitian bahwa terdapat perbedaan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Diperoleh nilai $p < 0.05$. Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan jumlah sel apoptosis yang signifikan pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Dengan nilai t positif menunjukkan bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*. Berdasarkan analisis deskriptif juga didapat bahwa rerata jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak, bila dibandingkan jumlah sel apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*.

Uji beda variabel yang digunakan adalah *independent sample t-test* untuk membuktikan hipotesis penelitian bahwa terdapat perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 diperoleh nilai $p < 0.05$ pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan jumlah sel pengeksresi CD95 yang signifikan pada kanker payudara tipe *medullary* dan tipe *non medullary*. Dengan nilai t positif menunjukkan bahwa jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*. Berdasarkan analisis deskriptif juga didapat bahwa rerata jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak, bila dibandingkan jumlah sel pengeksresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*.

Kanker payudara tipe *medullary* merupakan salah satu tipe kanker payudara dengan prognosis paling baik, bila dibandingkan dengan tipe infiltrating duktal karsinoma lain yang dalam penelitian ini dikategorikan sebagai tipe *non medullary*, berkaitan dengan mekanisme imunitas seluler tubuh terhadap pengendalian kanker. Tubuh dilengkapi dengan sistem pertahanan tubuh yang dalam keadaan normal dapat melindungi tubuh terhadap berbagai invasi baik mikroorganisme maupun sel tubuh sendiri yang mengalami transformasi menjadi ganas. Sistem imun tubuh dapat mengenali/membedakan antara antigen asing (*non-self*) dan antigen sendiri (*self*). Antigen tumor dapat memacu sistem imun dan berada di bawah kontrol genetik yang terbentuk akibat agen onkogenik. Antigen semacam ini disebut TAA (*Tumor Associated Antigen*).

Aktivasi antigen tumor melibatkan berbagai sel dalam sistem imun yaitu Th (*helper*), Ts (*supressor*), Tc (*cytotoxic*), sel B, makrofag, sel NK (*natural killer*

cells). Th dan Ts merupakan sel *immunoregulator* yang berperan dalam aktivasi maupun penghambatan aktivitas berbagai sel tubuh (Hebermann dkk. 1985). Apabila fungsi sel-sel tersebut rusak (*defect*), maka pengaturan sistem imun tubuh menjadi terganggu. Sel Tc dan sel NK berperan sebagai efektor yang akan melisis sel target. Makrofag berperan selain sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC), apabila diaktifkan maka akan mempunyai kemampuan untuk membedakan sel tumor dari sel-sel normal, yaitu melalui reseptor Fc yang terikat di permukaan sel tumor. Selain itu makrofag mensekresi faktor sitolitik seperti serin protease, hidrogen peroksida, *tumor necrosis factor* (TNF). Apabila terbentuk IgG oleh sel B akibat sensitisasi antigen tumor maka makrofag dapat bertindak sebagai efektor pada reaksi ADCC (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*). Aktivitas sel NK meningkat setelah diinkubasi dengan IFN- γ atau interleukin-2 (IL-2), sehingga kemampuan sitolitiknya meningkat. Jadi fungsi sistem imun tubuh yang normal antara lain melakukan pemantauan terhadap munculnya sel tubuh sendiri yang menjadi asing (*immunosurveillance*). Bila terjadi kegagalan sistem imun terhadap sel neoplastik maka dapat terjadi pertumbuhan abnormal tubuh (Yang, 2007).

CTL dan sel NK disebut juga sel pengeksresi CD95 karena kemampuannya untuk mengekspresikan ligan pada permukaannya, yang akan berikatan dengan reseptor fas di permukaan sel kanker untuk memicu terjadinya apoptosis.

Pada penelitian ini diperoleh bahwa jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* secara signifikan lebih banyak bila dibandingkan pada kanker payudara tipe *non medullary*. Terdapat korelasi positif antara jumlah sel yang mengalami apoptosis dengan jumlah sel pengeksresi

CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* dimana kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis selalu diikuti dengan kenaikan jumlah sel pengeksresi CD95. Kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* berkaitan dengan prognosis baik (Kajiwara et al, 1999) karena apoptosis yang dipicu secara ekstrinsik oleh aktivasi CTL (*Cytotoxic T-Lymphocyte*). CTL memicu terjadinya apoptosis melalui dua jalur, yaitu dengan melepaskan sitotoksik granula seperti perforin dan granzim. Atau melalui interaksi ligan reseptor Fas (CD95) dan Fas ligan. Berdasarkan analisa statistik penelitian ini, bahwa jumlah sel pengeksresi CD95 juga mengalami kenaikan seiring dengan kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary*. Sehingga apoptosis yang terjadi dimungkinkan karena interaksi ligan reseptor Fas (CD95) dan Fas ligan (FasL).

Fas (CD95) merupakan salah satu *Tumor Necrosis Factor* (TNF) yang banyak diekspresikan pada jaringan normal, termasuk jaringan payudara. Fungsi apoptosis ini berhubungan dengan gen tertentu yang menjadi faktor krusial untuk mengontrol apoptosis yaitu gen Fas (CD95). Diketahui bahwa FasL (Fas ligan) pada sel epitel kelenjar payudara ini terletak pada kromosom 17 p13.2. Setelah Fas berikatan dengan ligan pasangannya (Fas ligan/FasL) pada permukaan sel tumor, maka pada sitosol sel tumor akan terjadi aktivitas FADD (*Fas Associated Protein Death domain*). Aktivitas FADD memicu aktivasi kaskade kaspase dari *cysteine protease* yang akan mengaktifkan DNase sebagai enzim yang memfragmentasi DNA sel tumor, sehingga sel mengalami apoptosis (Lewis, 2009).

Dalam kaitannya dengan pengendalian tumorigenesis, apoptosis merupakan mekanisme penting untuk mencegah proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA, agar sel-sel dengan lesi DNA tersebut tidak dilipatgandakan, sehingga dalam hal ini apoptosis berfungsi sebagai salah satu kontrol *checkpoint* dalam siklus sel. Kegagalan sel-sel tumor untuk melaksanakan mekanisme apoptosis merupakan salah satu faktor yang mendasari pertumbuhan tumor yang makin lama makin besar, instabilitas genetik sel-sel bersangkutan dan resistensi terhadap kemoterapi. Defek mekanisme apoptosis dapat meningkatkan ketahanan hidup sel dan menambah kemungkinan ekspansi sel ganas. Akibat defek mekanisme apoptosis yang lain adalah memperbesar kemungkinan terjadinya keganasan selain akibat instabilitas genetik dan akumulasi kelainan genetik, juga akibat ketidakpatuhan terhadap aturan yang ditentukan pada *checkpoint* siklus sel untuk menginduksi apoptosis (Lewis, 2009).

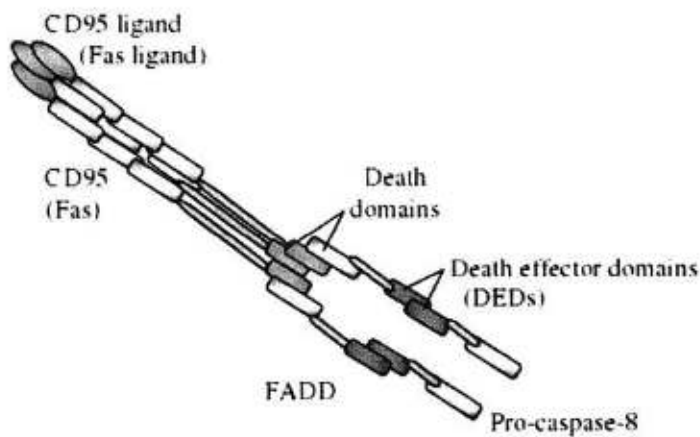
Proses apoptosis dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu: fase inisiasi atau induksi heterogen yang bergantung pada stimulus, fase efektor atau komitmen pada saat mana diambil keputusan untuk “bunuh diri”, dan fase degradasi atau eksekusi di mana sel-sel bersangkutan memperlihatkan gambaran biokimia dan morfologi apoptosis. Selama fase induksi atau inisiasi yang heterogen, sel menerima stimulus yang menginduksi kematian, kehilangan faktor-faktor yang menunjang ketahanan hidup, kekurangan suplai untuk metabolisme dan terjadi pengikatan reseptor yang meneruskan sinyal kematian misalnya pengikatan Fas/FasL, TNF/TNFR dan lain-lain. Reaksi kimia yang berperan dalam fase induksi ini sangat heterogen bergantung pada seberapa *lethal* stimulus yang diterimanya. Pada fase berikutnya, yaitu fase efektor, proses inisiasi dilanjutkan

dengan reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur, dan sel mengambil keputusan atau komitmen untuk “bunuh diri”. Pada fase selanjutnya, yaitu fase degradasi atau fase eksekusi, terjadi peningkatan berbagai aktivitas, termasuk peningkatan aktivasi enzim - enzim katabolik dan produksi *reactive oxygen species* (ROS). Pada fase ini perubahan morfologi dan biokimiawi sel, di antaranya fragmentasi DNA, degradasi berbagai jenis protein dan lain-lain menjadi lebih jelas. Semua sel mengalami apoptosis menurut pola tertentu dan menunjukkan bahwa sel-sel tersebut mengekspresikan semua komponen protein yang diperlukan untuk mengeksekusi kematian sel. Berbagai stimulus dapat mengawali fase inisiasi melalui aktivasi berbagai reseptor transmembran. Contoh khas dari stimulasi ini adalah pengikatan Fas (CD95) dengan FasL dan TNF- α dengan TNFR. Pada pengikatan Fas/FasL terjadi oligomerisasi dari reseptor yang mengakibatkan bagian intraseluler dari CD95 menggumpal dan dikenal dengan sebutan death domain. Protein lain yang kemudian direkrut dari sitoplasma dan berfungsi juga sebagai death domain adalah FADD (*Fas associated death domain*). FADD merupakan molekul adaptor yang berperan merekrut caspase. Untuk mempermudah proses ini molekul FADD mengandung molekul pengikat yang disebut DED (*death effector domain*) yang juga dimiliki oleh procaspase-8, sehingga keduanya dapat saling berikatan (Yakirevich, 2000).

Fas (CD95), suatu reseptor pada permukaan sel yang berikatan dengan FasL (CD95L) merupakan awal dari sinyal apoptosis. Sekuen asam amino yang merupakan unsur *death domain*, *death effector domain*, FADD dan procaspase-8 saling berikatan untuk menginduksi fase efektor. Pengikatan CD95 pada FADD terjadi akibat interaksi antara *death domain* kedua protein. Faktor - faktor lain

yang berperan pada inisiasi apoptosis adalah reseptor TNF (TNFR), CD27, CD30, CD40, DR3, DR4 dan DR5. Seperti halnya molekul CD95, molekul TNFR1, DR3, DR4 dan DR5 juga memiliki *death domain* walaupun masing-masing meneruskan sinyal apoptosis melalui jalur yang berbeda (Nilsen, 2000).

Beberapa penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pada saat berlangsung sinyal apoptosis melalui Fas, yang pertama terbentuk adalah Fas-DISC (*Fas-death inducing signal*). Salah satu komponen Fas-DISC adalah SADS (*small accelerator for death signaling*) yang fungsinya meningkatkan interaksi antara FADD dengan procaspase-8. Hambatan terhadap SADS memperlambat apoptosis. Fase terakhir dari apoptosis adalah eksekusi yang terjadi melalui aktivasi enzim *caspases* yang merupakan eksekutor utama dari apoptosis (Lewis, 2009)



Gambar 6.1. Jalur sinyal apoptosis melalui CD95 (Fas)

Caspase yang merupakan *protease cysteine*, selalu ada dalam sitosol sel normal dalam bentuk proenzim rantai tunggal (pro-caspases). Proenzim diaktivasi menjadi enzim protease yang berfungsi penuh melalui suatu proses *cleavage*

pertama pada proses mana rantai tunggal proenzim itu menjadi beberapa sub-unit caspases berukuran besar dan kecil, dan *cleavage* kedua untuk menghilangkan domain N-terminal. Aktivasi caspase dapat terjadi melalui interaksi antar caspase satu dengan yang lain melalui suatu kaskade aktivasi, tetapi juga dapat terjadi akibat diaktivasi oleh protease lain misalnya *granzyme* B yang diintroduksi ke dalam sel oleh limfosit sitotoksik dan merangsang apoptosis melalui aktivasi caspase-3. Caspase dengan prodomain pendek yang tidak memiliki kandungan protein interaksi (caspase 3,-6,-7) mungkin terutama diaktivasi melalui protease lain, dan caspase ini disebut caspase *down stream*, efektor atau eksekutor. Agregasi pro-caspase cukup untuk mengawali *auto-* atau *transprocessing* untuk menghasilkan caspase yang aktif. Agregasi pro-caspase terjadi melalui pengikatan molekul adaptor pada domain interaksi yang terdapat pada caspase, di antaranya yang merupakan *death effector domain* (DEDs) dan *caspases recruitment domain* (CARDs). (Lewis, 2009)

Berbagai stimulus dapat mengawali fase inisiasi melalui aktivasi berbagai reseptor transmembran. Contoh khas dari stimulasi ini adalah pengikatan Fas (CD95) dengan FasL dan TNF- α dengan TNFR. Pada pengikatan Fas/FasL terjadi oligomerisasi dari reseptor yang mengakibatkan bagian intraseluler dari CD95 menggumpal dan dikenal dengan sebutan death domain. Protein lain yang kemudian direkrut dari sitoplasma dan berfungsi juga sebagai *death domain* adalah FADD (*Fas associated death domain*). FADD merupakan molekul adaptor yang berperan merekrut caspase. Dengan adanya ikatan fas – ligan (*Fas – FasL*) pada permukaan sel kanker, maka pada sitosol sel kanker terjadi aktivitas FADD (*Fas Associated Protein Death Domain*) yang akan memicu aktivitas kaskade

kaspase. Kemudian kaspase yang aktif menyebabkan aktivasi enzim DNAase untuk memfragmentasi DNA sel kanker sehingga sel tersebut mengalami apoptosis (Yakirevich, 2000).

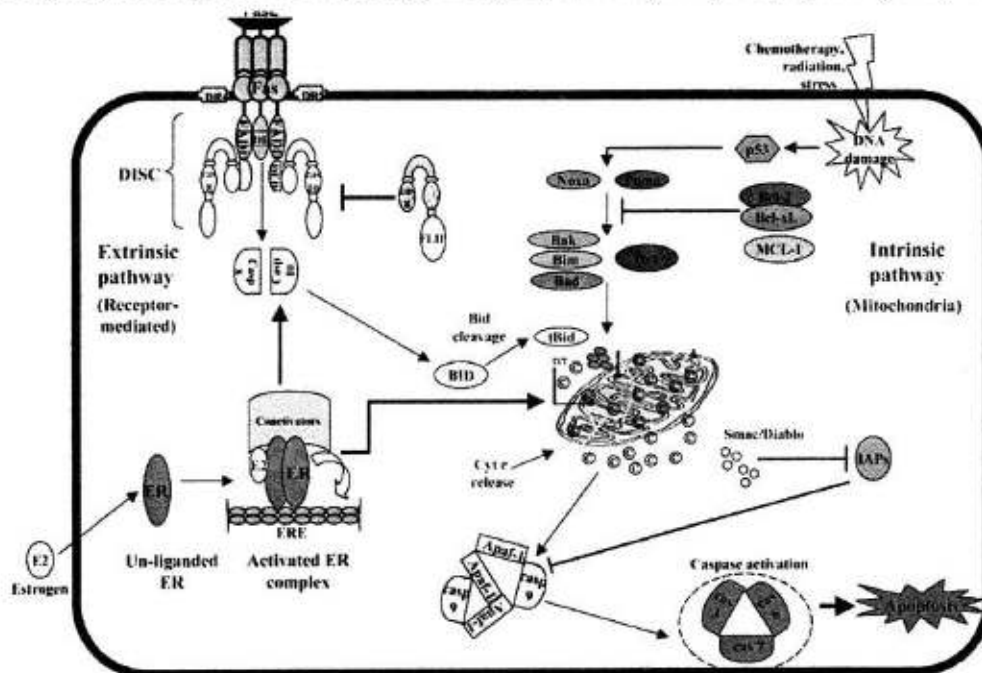
Berdasarkan data statistik deskriptif, bahwa frekuensi kejadian kanker payudara tipe *medullary* terbanyak pada wanita usia 39 tahun, atau usia *pre-menopausal*, dimana peran hormon estrogen penting dalam pertumbuhan dan perkembangan kanker. Bila dikaitkan dengan laporan pemeriksaan immunohistokimia untuk reseptor estrogen yang dilakukan pada penderita kanker payudara tipe *medullary*, diketahui bahwa 80% dari sampel penelitian memiliki status estrogen negatif yang diduga berhubungan dengan jumlah sel yang mengalami apoptosis (Yakirevich, 2000). Estrogen merupakan suatu hormon steroid yang memberikan karakteristik seksual pada wanita, mempengaruhi berbagai organ dan jaringan di antaranya terlibat pada regulasi proliferasi sel dan diferensiasi baik pada wanita atau pria. Estrogen menyebabkan perkembangan jaringan stroma payudara, pertumbuhan sistem duktus yang luas, dan deposit lemak pada payudara (Guyton and Hall, 1996). Diduga paparan yang berlebihan dari estrogen endogen dalam fase kehidupan perempuan berkontribusi dan mungkin merupakan faktor penyebab terjadinya kanker payudara (Yager and Davidson, 2006).

Awalnya, proses metastase kanker payudara diinisiasi oleh adanya aktivasi atau overekspresi beberapa protein, misalnya reseptor estrogen (ER) dan c-erbB-2 (HER2) yang merupakan protein predisposisi kanker payudara (Fuqua, 2001; Eccles, 2001). Sekitar 50% kasus kanker payudara merupakan kanker yang tergantung estrogen (Gibbs, 2000). Protein tersebut selain berperan dalam

metastasis, juga berperan dalam perkembangan kanker payudara (*early cancer development*). Estrogen berikatan dengan reseptor estrogen (ER) membentuk kompleks reseptor aktif dan mempengaruhi transkripsi gen yang mengatur proliferasi sel. Estrogen dapat memacu ekspresi protein yang berperan dalam *cell cycle progression*, seperti Cyclin D1, CDK4 (*cyclin-dependent kinases 4*), Cyclin E dan CDK2. Aktivasi reseptor estrogen juga berperan dalam aktivasi beberapa onkoprotein seperti Ras, Myc, dan CycD1 (Foster, 2001). Protein Myc merupakan protein faktor transkripsi yang penting untuk pertumbuhan, sedang CycD1 merupakan protein penting dalam kelangsungan *cell cycle progression* sehingga adanya aktivasi tersebut akan mengakibatkan perkembangan kanker yang dipercepat (Hanahan and Weinberg, 2000). Estrogen akan menstabilkan keberadaan protein Myc. Selain itu, kompleks estrogen dengan reseptornya juga akan memacu transkripsi beberapa gen tumor suppressor, seperti BRCA1, BRCA2, dan p53. Akan tetapi pada penderita kanker payudara (yang umumnya telah lewat masa menopause) gen-gen tersebut telah mengalami perubahan akibat dari proliferasi berlebihan sel payudara selama perkembangan sehingga tidak berperan sebagaimana mestinya (Adelmann, 2000; Clarke, 2000).

Estrogen berperan dalam perkembangan dan proliferasi sel kanker. Estrogen merangsang pertumbuhan dan menghambat terjadinya apoptosis pada sel kanker melalui mekanisme *estrogen receptor-mediated*. Berdasarkan penelitian Lewis-Wambi dan Jordan tahun 2009, dibuktikan bahwa estrogen justru memicu terjadinya apoptosis sel kanker payudara pada wanita usia *pre-menopausal* melalui dua jalur apoptosis, baik jalur ekstrinsik (ikatan CD95/Cd95L) maupun jalur instrinsik (jalur mitokondria).

Status *estrogen receptor* (ER) negatif pada kanker payudara tipe *medullary* menginduksi ekspresi CD95, yang menyebabkan terjadinya apoptosis (Liu, 2003).



Gambar 6.2 Mekanisme induksi estrogen dalam jalur apoptosis

Estrogen dalam bentuk 17β -estradiol (E2) berikatan dengan reseptor estrogen mengaktivasi *Estrogen- Responsive Element* (ERE) yang memunculkan ekspresi FasL. Sejumlah *transactivating factor* telah diidentifikasi sebagai regulator ekspresi gen FasL, antara lain *activator protein 1* (AP-1) dan *specificity*

protein 1 (Sp-1). Sp-1 terlibat dalam regulasi gen transkripsional dan juga telah diidentifikasi berperan penting dalam regulasi ekspresi gen FasL dan apoptosis. Faktor transkripsi ini dapat mengaktifkan promotor FasL melalui pengenalan elemen yang berbeda, dan aktivasi promotor FasL dapat dihambat oleh bentuk ekspresi mutan dominan-negatif Sp-1. Sp-1 sebagai efektor krusial memicu sinyal E2 untuk meningkatkan ekspresi FasL. Sehingga, adalah mungkin bahwa, ketika E2 meregulasi FasL, sinyal apoptosis dimulai dengan FasL yang terikat pada reseptor Fas/CD95 (Lewis, 2009).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

→ Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa :

1. Jumlah sel pengekspresi CD95 pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel pengekspresi CD95 pada kanker payudara tipe *non medullary*.
2. Jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* lebih banyak daripada jumlah sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *non medullary*.
3. Terdapat hubungan antara sel pengekspresi CD95 dan sel yang mengalami apoptosis pada kanker payudara tipe *medullary* dan *non medullary*, dimana kenaikan jumlah sel sel pengekspresi CD95 akan diikuti oleh kenaikan jumlah sel yang mengalami apoptosis.

7.2 Saran

→ Pemeriksaan imunohistokimia CD95 dan pemeriksaan TUNEL *assay* untuk apoptosis dapat digunakan sebagai dasar pengembangan prediktor dalam penentuan prognosis kanker payudara.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiolakis D, Simopoulos C, Cheva A, et al. 2002. Immunophenotypic profile of tumor infiltrating lymphocytes in medullary carcinoma of the breast. *Eur J Gynaecol Oncol*;23:433–436.
- Atwood K, Bisgaard K, Bloom KJ, et al. 2006. *Dakocytomation Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods*, Fourth edition. Dako – Carpinteria, California USA.
- Azoulay S, Lae M, Freneaux P, et al. 2005. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2005; 8:1623–1631.
- Bacus SS, Zelnick CR, Chin DM, et al. 1994. Medullary carcinoma is associated with expression of intercellular adhesion molecule-1. Implication to its morphology and its clinical behavior. *Am J Pathol*; 145: 1337–48.
- Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. 2006. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res*; 66:4636–4644.
- Bryan BB, Schnitt SJ, Collins LC, 2006. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol*;19:617–621.
- Charpin C, Bonnier P, Garcia S, et al. 1999. E-cadherin and beta-catenin expression in breast medullary carcinomas. *Int J Oncol*; 15: 285-92.
- Coronella, J. A., P. Telleman, G. A. Kingsbury, T. D. Truong, S. Hays, and R. P. Junghans. 2001. Evidence for an antigen-driven humoral immune response in medullary ductal breast cancer. *Cancer Res*. 61:7889.
- De Cremoux P, Salomon AV, Liva S, et al. 1999. p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*; 91: 641–3.
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*; 13:4429–4434.
- Eisinger, F., C. Noguez, D. Birnbaum, J. Jacquemier, and H. Sobol. 1998. BRCA1 and medullary breast cancer. *JAMA* 280:1227.
- Elston CW, Ellis IO, 1991. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19: 403–10.

- Eichhorn JH, 2004. Medullary carcinoma, provocative now as then. *Semin Diagn Pathol* 21:65–73.
- Feinmesser M, Sulkes A, Morgenstern S, et al. 2000. HLA-DR and $\beta 2$ microglobulin expression in medullary and atypical medullary carcinoma of the breast: histopathologically similar but biologically distinct entities. *J Clin Pathol*; 53: 286–91.
- Feiner H, Li P, et al. 2003. Differential amplification and overexpression of HER-2/neu, p53, MIB1, and estrogen receptor/progesterone receptor among medullary carcinoma, atypical medullary carcinoma, and high-grade invasive ductal carcinoma of breast archives of pathology and laboratory medicine 127; 11: 1458–64.
- Gaffey MJ, Frierson HF Jr, Mills SE, et al. 1993. Medullary carcinoma of the breast. Identification of lymphocyte subpopulations and their significance. *Mod Pathol*; 6: 721–8.
- Hansen MH, Nielsen HV, Ditzel HJ, 2002. Translocation of an intracellular antigen to the surface of medullary breast cancer cells early in apoptosis allows for an antigen-driven antibody response elicited by tumor-infiltrating B cells. *J Immunol*; 169:2701–11.
- Honrado E, Benítez J, Palacio J. 2006. Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Critical Revn Oncol/HematoL*; 59: 27–39.
- IAPI. 2008. Pedoman Penanganan Bahan Pemeriksaan untuk Histopatologi. IAPI Jakarta.
- Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, et al. 2005. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol*; 207:260–8.
- Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, et al. 2007. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res*; 9:R16.
- Jensen V, Jensen ML, Kiaer H, et al. 1997. MIB-1 expression in breast carcinomas with medullary features: an immunohistological study including correlations with p53 and bcl-2. *Virchows Arch* ; 431: 125–30.
- Jiang SY, Jordan VC: Growth regulation of estrogen receptor-negative breast cancer cells transfected with complementary DNAs for estrogen receptor. *J Natl Cancer Inst* 1992, 84:580-591.
- Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR: DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1998, 1:543-551

- Kotlan B, Simsa P, Teillaud JL, et al. 2005. Novel ganglioside antigen identified by B cells in human medullary breast carcinomas: The proof of principle concerning the tumor-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol*; 175: 2278–85.
- Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Bartelink H, Van de Vijver MJ, 2007. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*; 9:R65.
- Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*; 11:5175–5180.
- Leek RD, Harris AL, 2002. Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*; 7: 1779. –8
- Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: how can hormone stimulate and inhibit. *Breast Cancer Research* 2009, 11:206.
- Lin EY, Pollard JW, 2004. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer*; 90:2053–2058.
- Livasy CA, Perou CM, Karaca G, et al. 2007. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*; 38:197–204.
- Ljunggren HG, Malmberg KJ, 2007. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 7: 329–339.
- Mor G, Kohen F, Garcia-Velasco J, Nilsen J, Brown W, Song J, Naftolin F: Regulation of fas ligand expression in breast cancer cells by estrogen: functional differences between estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 73: 185-194.
- Nilsen J, Mor G, Naftolin F: Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system. *J Neurobiol* 2000, 43: 64-78.
- Putti TC, Abd El-Rehim DM, Rakha EA, et al. 2005. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol*; 18: 3526–50.
- Peter ME, Krammer PH: The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003, 10:26-35.

- Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S: Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997, 11:1569-1580.
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008; 26:2568–2581.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO, 2007. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer J*; 109:25–32.
- Rodriguez-Pinilla SM, Rodriguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, et al. 2007. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol*;31:501–508.
- Reis-Filho JS, Tutt AN, 2008. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*; 52:108–118.
- Reed JC, 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*,17:2941–2953.
- Shousha S, 2000. Medullary carcinoma of the breast and BRCA1 mutation. *Histopathology*; 37: 182–5.
- Salomon AV, Gruel N, Lucchesi C, et al. 2007. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res*; 9: 24.
- Song RX, Mor G, Naftolin F, McPherson RA, Song J, Zhang Z, Yue W, Wang J, Santen RJ: Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17beta-estradiol. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93:1714-1723.
- Tot T, 2000. The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. *Histopathology*; 37: 175–81.
- West M, Blanchette C, Dressman H, et al. 2001. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:11462 – 11467.
- Yakirevich E, Maroun L, Cohen O, 2000. Apoptosis, proliferation, And Fas (APO-1, CD95)/Fas ligand expression in medullary carcinoma of the breast. *J Pathology* 192: 166-173.
- Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, et al. 2007. NK cells and cancer. *J Immunol* 178: 4011–4016.

Lampiran 1 : Prosedur pengecatan imunohistokimia

Sampel yang memenuhi kriteria penelitian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan teknik imunoperoksidase terhadap ekspresi protein sel NK, ligan pada permukaan sel NK, sel yang mengalami apoptosis pada blok parafin yang sama dengan blok parafin yang telah dipulas dengan metode rutin Hematoksilin Eosin pada pemeriksaan histopatologis. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan oleh ahli Patologi Rumah Sakit Onkologi Surabaya, dengan langkah sebagai berikut :

1. Persiapan :

- 1) Jaringan dipotong setebal \pm 4 mikron, ditempelkan pada kaca obyektif untuk pemeriksaan Imunohistokimia (*slide superfrost*).
- 2) Panaskan sediaan pada *hot plate* dengan suhu 65°C selama 30 menit, sebelum deparafinisasi.
- 3) Lakukan pengenceran antibodi primer sesuai pemakaian, baik volume maupun titernya.
- 4) Lakukan pencampuran DAB : 1 tetes DAB (warna coklat + 1 ml *chromogen substrate*), campuran ini hanya bisa digunakan dalam waktu 2 minggu.
- 5) Lakukan persiapan alat-alat yang digunakan, pastikan alat-alat bersih.

2. Prosedur :

- 1) Lakukan deparafinisasi dengan *Xylene* 3 kali masing - masing selama 5 menit.
- 2) Lakukan hidrasi dengan alkohol masing – masing selama 2 menit.

- 3) Cuci di bawah air mengalir dan aquadest masing – masing 5 menit.
- 4) Antigen Retrieval (*Buffer Citrate*). Masukkan wadah (*microwave jar*) berisi *buffer citrate* pada Microwave sampai hangat dan jangan sampai mendidih, kemudian dinginkan sampai suhu kurang lebih sampai 40 °C.
- 5) Masukkan sediaan pada wadah yang berisi *buffer citrate*, tutup dengan plastik.
- 6) Panaskan sampai mendidih dengan indikator: plastik menggelembung, putar tombol *defrost* selama 15 menit dan amati gelembung air mendidih tetap konstan.
- 7) Dinginkan wadah dengan membuka plastik penutup dan didinginkan dengan kipas angin sampai suhu mencapai suhu kamar selama 20 menit.
- 8) Cuci sediaan dalam wadah yang berisi Tris buffer selama \pm 5 menit dengan menggerakkan *holder staining*.
- 9) Berikan tanda dengan *pen immunologic* seluas sayatan yang ada.
- 10) Berikan 3 - 4 tetes Peroxidase Bloking (Dakocytomation)
- 11) Inkubasi Peroxidase Bloking selama 10 menit pada suhu kamar.
- 12) Cuci sediaan dalam wadah yang berisi Tris buffer selama \pm 5 menit dengan menggerakkan *holder staining*.
- 13) Letakkan masing –masing sediaan dalam *Incubator rack* dan tutup.
- 14) Teteskan antibodi primer sebanyak 100 μ l tepat pada sayatan yang sudah diberi marker pen dan tutup *incubator rack*, lalu inkubasi selama pada suhu 4°C selama *overnight*.
- 15) Cuci sediaan dalam wadah yang berisi Tris buffer selama \pm 5 menit dengan menggerakkan *holder staining*.

- 16) Tetesi dengan *Antibody enhancer* lalu inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit.
- 17) Cuci sediaan dalam wadah yang berisi Tris buffer selama \pm 5 menit dengan menggerakkan *holder staining*.
- 18) Tetesi dengan *Polymerized HRP - anti mouse IgG* kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan.
- 19) Cuci sediaan dalam wadah yang berisi Tris buffer selama \pm 5 menit dengan menggerakkan *holder staining*.
- 20) Tetesi dengan DAB \rightarrow 10 menit, pada tahap ini terjadi interaksi warna coklat bila positif.
- 21) Cuci dengan air mengalir.
- 22) *Counterstain* dengan Meyer Hematoksilin.
- 23) *Clearing* dengan *Xylene* selama 2 kali masing – masing 5 menit.
- 24) *Mounting* sediaan dengan *EZ Mount* (entelan).
- 25) Amati di bawah mikroskop

Lampiran 2 : Dasar teknologi, prinsip metode apoptag, dan prosedur pemeriksaan apoptosis

A. Dasar Tekonologi

Dasar teknologi apoptag adalah TUNEL (*Terminal Deoxyuridine Nukleotide End Labeling*) Assay. Kerusakan *strand* DNA dideteksi dengan melabel ujung bebas 3-OH secara enzimatis dengan nukleotida yang dimodifikasi. Ujung DNA yang terbentuk dari fragmentasi DNA ini ada pada inti yang mengalami apoptosis maupun *apoptotic bodies*. Sedangkan pada inti yang normal maupun yang berproliferasi, dimana terdapat ujung 3-OH dalam jumlah yang signifikan, tidak tercatat oleh kit.

Apoptag detection kit mendeteksi *single strand break* maupun *double strand break* yang berhubungan dengan apoptosis. Teknik ini dapat mendeteksi tahap awal apoptosis pada saat terjadi kondensasi kromatin dan kerusakan *strand* DNA masih sedikit, sebelum terjadi perubahan morfologis pada inti.

B. Prinsip metode apoptag

Reagen pada *Apoptag detection kit* dirancang untuk menyambung ujung 3-OH secara *in situ* dengan nukelotida yang dilabel ataupun yang tidak dilabel secara kimiawi, nukelotida pada apoptag dilabel dengan digoxigenin untuk metode *indirect*. Nukleotida yang terkandung pada reaction buffer disambung dengan ujung 3-OH dari DNA secara enzimatis dengan bantuan *terminal deoxynucleotidyl transferase* (Tdt). Tdt mengkatalisis penyambungan *triphosphate nucleotide* ke ujung 3-OH dari *single strand* maupun *double strand* DNA. Nukleotida yang dipakai terdiri dari nukleotida yang dilabel atau tidak dilabel digoxigenin. Pelabelan nukleotida dengan digoxigenin secara acak

bertujuan untuk memicu ikatan antibodi anti digoxigenin dengan digoxigenin.

Prinsip pemeriksaan dengan *Apoptag detection kit* adalah fragmen DNA yang telah disambung dengan nukleotida yang dilabel digoxigenin diikat dengan *anti digoxigenin peroxidase conjugate* sehingga dengan penambahan substrat kromogenin pada sel yang mengandung ujung 3-OH akan berwarna kecoklatan, sedangkan sel yang tidak mengandung ujung 3-OH akan berwarna hijau.

C. Prosedur pemeriksaan apoptosis

Sediaan yang telah diproses secara rutin menjadi *paraffin block embedding tissue* sampai menjadi potongan jaringan tipis yang diletakkan di kaca obyek, dilanjutkan dengan tahapan sebagai berikut :

1. Deparafinisasi jaringan

- 1) Sediaan dicuci dengan xylene 3 kali masing –masing selama 5 menit.
- 2) Cuci sediaan 2 kali dengan etanol absolut masing –masing selama 5 menit.
- 3) Cuci sediaan dengan etanol 95% dan satu kali dengan etanol 70% masing – masing selama 3 menit.
- 4) Cuci sediaan dengan PBS selama 5 menit.

2. Persiapan jaringan

- 1) Teteskan proteinase K (20 μ g/ml) pada sediaan (60 μ /5cm²) selama 15 menit, dengan inkubasi pada suhu 37° C.
- 2) Cuci sediaan sebanyak 2 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing – masing selama 2 menit.

3. Menghilangkan *endogenous peroxidase*
 - 1) Teteskan 3% H₂O₂ dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar.
 - 2) Cuci sediaan sebanyak 2 kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing – masing selama 2 menit.
4. Aplikasi *equibration buffer*
 - 1) Hilangkan kelebihan cairan di sekitar potongan jaringan dengan hati – hati menggunakan kertas pengering.
 - 2) Segera aplikasikan *equibration buffer* 75 µl secara langsung pada sediaan.
 - 3) Inkubasi selama kurang lebih 10 detik pada suhu kamar.
5. Aplikasi *working strength TdT enzyme*
 - 1) Hilangkan kelebihan cairan di sekitar potongan jaringan dengan hati – hati menggunakan kertas pengering.
 - 2) Segera teteskan *working strength TdT enzyme* 55 µl/5cm² pada jaringan.
 - 3) Inkubasi pada suhu 37° C dalam wadah lembab selama 1 jam.
6. Aplikasi *stop wash buffer*
 - 1) Letakkan sediaan pada *coplin jar* yang berisi *working strength stop wash buffer*, goyangkan selama 15 detik kemudian inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
 - 2) Siapkan *anti – digoxigenin peroxidase conjugate* dari tempat penyimpanan dan hangatkan pada suhu kamar.
7. Aplikasi *anti – digoxigenin peroxidase conjugate*
 - 1) Cuci sediaan sebanyak 3 kali dalam PBS yang berbeda masing – masing selama 1 menit.

- 2) Hilangkan kelebihan cairan diantara potongan jaringan secara hati – hati dengan kertas pengering.
 - 3) Teteskan *anti – digoxigenin peroxidase conjugate* pada sediaan, gunakan kurang lebih $65 \mu\text{l}/5\text{cm}^2$ dari permukaan jaringan.
 - 4) Inkubasi pada suhu kamar dalam wadah lembab selama 30 menit.
8. Pencucian dalam larutan PBS
- 1) Cuci sediaan sebanyak 4 kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing – masing selama 2 menit pada suhu kamar.
 - 2) Siapkan *working strength peroxidase substrate*.
9. Pemberian warna pada sediaan dengan *peroxidase substrate*
- 1) Hilangkan kelebihan cairan diantara potongan jaringan secara hati – hati dengan kertas pengering.
 - 2) Aplikasikan secukupnya *peroxidase substrate* sampai menutupi seluruh permukaan jaringan ($75 \mu\text{l}/5\text{cm}^2$).
 - 3) Inkubasi pada suhu kamar selama 3 – 6 menit.
 - 4) Untuk menentukan waktu pewarnaan yang optimal, monitor timbulnya warna dengan melihat slide di bawah mikroskop cahaya.
10. Cuci sediaan
- 1) Cuci sediaan 3 kali dengan dH_2O dalam *coplin jar* masing – masing selama 1 menit.
 - 2) Inkubasi slide dengan dH_2O dalam *coplin jar* selama 5 menit pada suhu kamar.

11. Aplikasi *counterstain*

- 1) *Counterstain* dengan *methyl green* dalam *coplin jar* selama 10 menit pada suhu kamar.
- 2) Cuci sediaan 3 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar*, masukkan slide 10 kali masing –masing dalam pencucian pertama dan kedua, lanjutkan dengan 30 detik tanpa digoyangkan dalam pencucian ketiga.
- 3) Cuci sediaan dengan N-butanol 100% dalam *coplin jar*, masukkan slide 10 kali masing –masing dalam pencucian pertama dan kedua, lanjutkan dengan 30 detik tanpa digoyangkan dalam pencucian ketiga.

12. *Mounting* sediaan dengan *EZ Mount* (entelan).

13. Amati di bawah mikroskop.

Lampiran 3 : Prosedur pengecatan hematoksin Eosin

- a. Lakukan prosesi jaringan dengan alat *Auto Technicon* selama 16 jam dengan cara :

No	Proses	Larutan kimia	Waktu
1.	<i>Fiksasi</i>	Formalin buffer 10 %	2 jam
2.	<i>Dehidrasi</i>	- Alkohol 70 %	1 jam
		- Alkohol 80 %	1 jam
		- Alkohol 80 %	1 jam
		- Alkohol 99 %	1 jam
		- Alkohol 99 %	1 jam
		- Alkohol 99 %	2 jam
3.	<i>Clearing</i>	- Xillol	1 jam
		- Xillol	1 jam
		- Xillol	2 jam
4.	<i>Impregnasi</i>	- Parafin solid (60° C)	1 jam
		- Parafin cair (60° C)	2 jam

- b. Lakukan pengeblokan (*embedding*) dengan cara :
- Lepaskan *cover slip* dari kaset, letakkan kaset yang berisi bahan/jaringan ke *hot plate*.
 - Isi *base mould* dengan parafin cair (60° C) hingga penuh pada permukaan, tanam jaringan dalam *base mould* dengan posisi sesuai yang dikehendaki.
 - Letakkan *base mould* yang sudah terisi pada *cold plate* pada suhu - 10° C.
 - Lepaskan kaset dari *base mould* dengan menggunakan silet bila parafin sudah cukup keras.
 - Letakkan blok parafin pada *head holder microtome*
 - Lakukan *trimming* blok parafin dengan *disposable blade* bekas
 - Atur derajat kemiringan *disposable blade*
 - Ganti *disposable blade* bila sudah tumpul
 - Lakukan penyayatan ± 3–5 μ sampai mendapatkan sayatan yang baik (tipis dan semua bagian ikut tersayat) dalam bentuk pita memanjang

- Angkat sayatan yang diperoleh dengan menggunakan kuas kecil
- Masukkan sayatan yang ke dalam *tissue flotation bath* dengan suhu antara 42 - 45° C
- Seleksi sayatan yang utuh
- Angkat sayatan dengan kaca obyek sesuai label nomor PA
- Miringkan sayatan yang sudah menempel pada kaca obyek
- Letakkan dalam *hot plate* selama 5 menit
- Letakkan kaca obyek dalam *staining rack* dan siap diwarnai dengan metode pewarnaan Hematoksilin Eosin.
- Lakukan pengecatan :

Teknik pengecatan yang dilakukan di RS. Onkologi Surabaya adalah pewarnaan *progesif* dengan menggunakan cat HE (Hematoksilin Eosin) :

No.	Proses	Larutan kimia	Waktu
1.	<i>Deparafinisasi</i>	- Xillol - Xillol - Xillol	5 menit 5 menit 5 menit
2.	<i>Hidrasi</i>	- Alkohol 99 % - Alkohol 80 % - Alkohol 70 %	2 menit 2 menit 2 menit
3.	<i>Cuci dengan air mengalir</i>	Air	10 menit
4.	<i>Cat utama</i>	Meyer's Hematoksilin	10 menit
5.	<i>Cuci dengan air mengalir</i>	Air	15 menit
6.	<i>Cat pembeding</i>	Eosin 1 %	30 detik
7.	<i>Dehidrasi</i>	- Alkohol 80 % - Alkohol 99 % - Alkohol 99 %	1 menit 1 menit 1 menit
8.	<i>Clearing</i>	- Xillol - Xillol	5 menit 5 menit
9.	<i>Mounting</i>	Mount EZ entelan	

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
APO	20	60.50	27.237	10	90
CD95	20	57.00	24.301	10	90

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		APO	CD95
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	60.50	57.00
	Std. Deviation	27.237	24.301
Most Extreme Differences	Absolute	.213	.154
	Positive	.150	.108
	Negative	-.213	-.154
Kolmogorov-Smirnov Z		.953	.687
Asymp. Sig. (2-tailed)		.324	.732

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
APO	20	41.50	25.397	10	80
CD95	20	42.00	21.423	10	70

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		APO	CD95
N		20	20
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	41.50	42.00
	Std. Deviation	25.397	21.423
Most Extreme Differences	Absolute	.201	.196
	Positive	.201	.148
	Negative	-.169	-.196
Kolmogorov-Smirnov Z		.901	.875
Asymp. Sig. (2-tailed)		.392	.429

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 6 : T-Test Apoptosis Medullary vs Non Medullary

Group Statistics

	jenis kanker payudara medullary	jenis kanker payudara non medullary
N	20	20
Mean	60,50	41,50
Std. Deviation	27,237	25,397
Std. Error Mean	6,090	5,679

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means								
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference			
apo	,062	,805	2,282	38	,028	19,000	8,327	Lower	2,142	Upper	35,858
								Upper	2,140	Lower	35,860
			2,282	37,816	,028	19,000	8,327				

Lampiran 7 : t-test CD95 Medullary vs Non Medullary

Group Statistics

	jenis kanker payudara	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
cd95 medullary	20	57,00	24,301	5,434	
non medullary	20	42,00	21,423	4,790	

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
cd95 Equal variances assumed	,185	,670	2,071	38	,045	15,000	7,244	,336	29,664
Equal variances not assumed			2,071	37,412	,045	15,000	7,244	,328	29,672

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
APO	60.50	27.237	20
CD95	57.00	24.301	20

Correlations

		APO	CD95
APO	Pearson Correlation	1	.877**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	20	20
CD95	Pearson Correlation	.877**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
APO	61.50	23.005	20
CD95	56.50	24.121	20

Correlations

		APO	CD95
APO	Pearson Correlation	1	.816**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	20	20
CD95	Pearson Correlation	.816**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	20	20

** . Correlation is significant at the 0.01 level

mpiran 10 : Uji Korelasi Apoptosis - CD95 Medullary vs Non Medullary**Descriptive Statistics**

	Mean	Std. Deviation	N
APO	51.00	27.717	40
CD95	49.50	23.853	40

Correlations

		APO	CD95
APO	Pearson Correlation	1	.552**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	40	40
CD95	Pearson Correlation	.552**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	40	40

** . Correlation is significant at the 0.01 level

Group Statistics

TIPE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
OBS1 medullary	20	60.50	27.237	6.090
non medullary	20	41.50	25.397	5.679
OBS2 medullary	20	67.00	21.300	4.763
non medullary	20	57.50	21.975	4.914

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
OBS1 Equal variances assumed	.062	.805	2.282	38	.028	19.00	8.327	2.142	35.858
Equal variances not assumed			2.282	37.816	.028	19.00	8.327	2.140	35.860
OBS2 Equal variances assumed	.024	.879	1.388	38	.173	9.50	6.843	-4.353	23.353
Equal variances not assumed			1.388	37.963	.173	9.50	6.843	-4.354	23.354

Group Statistics

TIPE	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
OBS1 medullary	20	57.00	24.301	5.434
OBS1 non medullary	20	42.00	21.423	4.790
OBS2 medullary	20	57.00	24.942	5.577
OBS2 non medullary	20	56.00	26.036	5.822

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
OBS1	.185	.670	2.071	38	.045	15.00	7.244	.336	29.664
			2.071	37.412	.045	15.00	7.244	.328	29.672
OBS2	.012	.913	.124	38	.902	1.00	8.062	-15.321	17.321
			.124	37.930	.902	1.00	8.062	-15.322	17.322

Lampiran 13 :

Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel kanker payudara tipe medullary yang mengalami apoptosis pada pembesaran 400X

No.	No. PA	Observer	Usia	ER status
1.	PO. 0710014	90	62	negatif
2.	PO. 0505003	30	61	positif
3.	PO. 0801026	90	56	negatif
4.	PO. 0704006	20	39	positif
5.	PO. 0711003	90	61	negatif
6.	PO. 0910060	50	82	negatif
7.	PO. 0706030	40	55	negatif
8.	PO. 0602056	80	57	negatif
9.	PO. 0502027	20	49	negatif
10.	PO. 0801027	10	40	positif
11.	PO. 0908035	50	42	negatif
12.	PO. 0603008	60	52	negatif
13.	PO. 0903042	80	68	negatif
14.	PO. 0508036	90	52	negatif
15.	PO. 0809036	80	39	negatif
16.	PO. 0907004	50	39	negatif
17.	PO. 0608036	90	46	negatif
18.	PO. 0504038	90	76	negatif
19.	PO. 0710033	50	62	negatif
20.	PO. 0907062	50	56	positif

Uji komparasi observer 1 vs observer 2

	Levene's Test for Equality of Variances	
	F	Sig
Observer 1 Equal variances assumed	0.062	0.805*
Observer 2 Equal variances assumed	0.024	0.879*

Tanda * : tidak ada beda signifikan ($p > 0.05$)

Lampiran 14 :

Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel kanker payudara tipe non medullary yang mengalami apoptosis pada pembesaran 400X

No.	No. PA	Observer	Usia	ER status
1.	PO. 0812054	80	59	negatif
2.	PO. 0805050	20	63	positif
3.	PO. 0905035	80	60	negatif
4.	PO. 0905064	50	53	negatif
5.	PO. 0907067	70	71	negatif
6.	PO. 0708012	20	38	positif
7.	PO. 0706006	50	42	positif
8.	PO. 0612044	30	73	positif
9.	PO. 0703006	20	42	positif
10.	PO. 0703051	10	53	positif
11.	PO. 0904017	40	70	negatif
12.	PO. 0811040	20	59	positif
13.	PO. 0902007	20	53	positif
14.	PO. 0803046	70	41	negatif
15.	PO. 0905031	30	49	negatif
16.	PO. 0708003	70	44	negatif
17.	PO. 0805056	10	63	positif
18.	PO. 0812090	10	37	negatif
19.	PO. 0701063	70	52	negatif
20.	PO. 0902007	60	53	negatif

Uji komparasi observer 1 vs observer 2

	Levene's Test for Equality of Variances	
	F	Sig
Observer 1 Equal variances assumed	0.185	0.670*
Observer 2 Equal variances assumed	0.012	0.913*

Tanda * : tidak ada beda signifikan ($p > 0.05$)

Lampiran 15 :

Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah CD95 pada sel kanker payudara tipe medullary pada pembesaran 400X

No. PA	Observer	Usia
PO. 0710014	80	62
PO. 0505003	10	61
PO. 0801026	80	56
PO. 0704006	30	39
PO. 0711003	70	61
PO. 0910060	40	82
PO. 0706030	50	55
PO. 0602056	80	57
PO. 0502027	10	49
PO. 0801027	40	40
PO. 0908035	40	42
PO. 0603008	70	52
PO. 0903042	60	68
PO. 0508036	70	52
PO. 0809036	80	39
PO. 0907004	50	39
PO. 0608036	90	46
PO. 0504038	90	76
PO. 0710033	40	62
PO. 0907062	60	56

Lampiran 16 :**Hasil pengamatan dan penghitungan jumlah CD95 pada sel kanker payudara tipe non medullary pada pembesaran 400X**

No. PA	Observer	Usia
PO. 0812054	60	59
PO. 0805050	70	63
PO. 0905035	10	60
PO. 0905064	60	53
PO. 0907067	20	71
PO. 0708012	50	38
PO. 0706006	20	42
PO. 0612044	50	73
PO. 0703006	10	42
PO. 0703051	60	53
PO. 0904017	10	70
PO. 0811040	30	59
PO. 0902007	50	53
PO. 0803046	70	41
PO. 0905031	50	49
PO. 0708003	30	44
PO. 0805056	40	63
PO. 0812090	20	37
PO. 0701063	60	52
PO. 0902007	70	53



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 11/EC/KEPK/FKUA/2010

KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

**Perbedaan Jumlah Sel Pengekspresi CD95 dan Apoptosis Pada
Kanker Payudara Tipe *Medullary* dan *Non Medullary***

PENELITI UTAMA :

Luh Ade Wilan Krisna, S.Si (NIM: 090810508/M)

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN :

**Laboratorium Patologi Anatomi RS Onkologi Surabaya dan
Laboratorium Molekular Universitas Airlangga Surabaya**

DINYATAKAN LAIK ETIK.

Surabaya, 23 Maret 2010



[Signature]
Prof. M. Sajid Darmadipura, dr., SpS, SpBS

Nomor : 14/RSOS/Eks/Adm/III/2010
Lampiran : -
Hal : Ijin Penelitian

Surabaya, 24 Maret 2010

Kepada Yth.
Prof. Dr. Muhammad Amin, dr.,Sp.P (K)
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga
Surabaya

Dengan hormat,

Menindaklanjuti surat Saudara perihal ijin penelitian untuk mahasiswa:

Nama : Luh Ade Wilan Krisna, S.Si
NIM : 090810508M
Program Studi : Ilmu Kedokteran Dasar
Minat Studi : Patobiologi

bersama ini kami sampaikan bahwa kami **memberikan ijin** kepada mahasiswa tersebut untuk melakukan penelitian dengan judul "Perbedaan sel pengekspresi CD95 dan apoptosis pada kanker payudara tipe *Medullary* dan *Non Medullary*" di Rumah Sakit Onkologi Surabaya.

Adapun ketentuan yang perlu diperhatikan adalah:

1. Selama penelitian, yang bersangkutan harus selalu mematuhi peraturan dan kebijakan yang berlaku di Rumah Sakit Onkologi Surabaya
2. Hasil penelitian disampaikan kepada Rumah Sakit Onkologi Surabaya melalui Departemen Pengembangan

Demikian yang dapat kami sampaikan, atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.

Hormat kami,



Estiningtyas N, SKM., MARS
Direktur

Surgeon
Iskandar Ali, M.D
Wiwien Rianto, M.D
Ario Djatmiko, M.D
Radiologist
Sri Redjeki, M.D
Anggraheny S., M.D
Lies Mardiyana, M.D
Haematology-Oncologist
Ami Ashariati, M.D
Pathologist
Sindrawati, M.D
Anesthesiologist
M. Sariyanto, M.D
Agus Setyana, M.D

CD95 (Fas) Ab-3 (Clone GM30)

Mouse Monoclonal Antibody

Cat. #MS-1098-S0, -S1, or -S (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml Supernatant)

Cat. #MS-1098-PCS (5 Slides) (Positive Control for Histology)

Description: CD95, also known as Fas, is a transmembrane glycoprotein. It is a member of the nerve growth factor receptor/tumor necrosis factor superfamily. This cell surface molecule mediates receptor-triggered apoptosis. The Fas antigen is expressed on the surface of various cell types, including activated T and B lymphocytes and T lymphoblastoid cell lines.

Comments: Ab-3 will enable further investigation of the expression of Fas antigen in normal and malignant tissues as well as in studies of the interaction of Fas and Fas ligand.

Mol. Wt. of Antigen: 48kDa

Epitope: Internal domain near the C-terminus

Species Reactivity: Human. Others not-known.

Clone Designation: GM30

Ig Isotype: IgG₁

Immunogen: Recombinant protein corresponding to the internal domain near the C-terminal end of the Fas molecule.

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunohistology (Formalin/paraffin)
(Use Ab at 1:15-1:30 for 60 min at RT)
- [Staining of formalin-fixed tissues REQUIRES boiling tissue sections in 10mM citrate buffer, pH 6.0, (NEOMARKERS' Cat. #AP-9003), for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.]
 - Immunohistochemistry requires the use of a high-efficiency detection system such as UltraVision LP (Cat# TL-015).

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Small intestine

Cellular Localization: Cell membrane

Supplied As:

Tissue culture supernatant with 0.09% sodium azide,
or

Prediluted antibody which is ready-to-use for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Storage and Stability:

Store vial at -20°C. When stored at -20°C, this antibody is stable for 24 months. Diluted antibody is stable for two weeks when stored at 4°C.

Suggested References:

1. Sasaki Y, et al. British Journal of Urology. 81: 852-855 (1998).
2. Sugihara A, et al. Anticancer Research. 17: 3861-3866 (1997).
3. Kondo E, et al. J. Pathol. 183(1):75-79(1997).

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

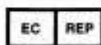
This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only

Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538, USA
Tel: 1-510-771-1560
Fax: 1-510-771-1570
<http://www.thermo.com/labvision>



Manufactured by:
NeoMarkers
For
Lab Vision Corporation



Thermo Fisher Scientific
Anatomical Pathology
93-96 Chadwick Road, Astmoor
Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK
Tel: 44-1928-562600
Fax: 44-1928-562627
labvision_uk@thermofisher.com