

616.934  
m1e  
y el

**PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCB) PADA  
PERUBAHAN EPIDERMIS  
DAN SEBARAN LIMFOSIT INTRADERMAL  
MENCIT C3H YANG TERPAPAR KARSINOGEN TER**

*(A comparative study of epidermal changes and intradermal lymphocyte  
infiltration using DNCB on tar-induced C3H mouse skin)*



Tesis  
untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai derajat Sarjana S-2

**Magister Ilmu Biomedik**

Ika Pawitra Miranti  
G4A097004

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
Oktober  
2001

UPT-PUSTAK-UNDIP

## TESIS

**PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCB)  
PADA PERUBAHAN EPIDERMIS  
DAN SEBARAN LIMFOSIT INTRADERMAL  
MENCIT C3H YANG TERPAPAR KARSINOGEN TER**

disusun oleh

Ika Pawitra Miranti  
G4A097004

telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
pada tanggal 5 Oktober 2001  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

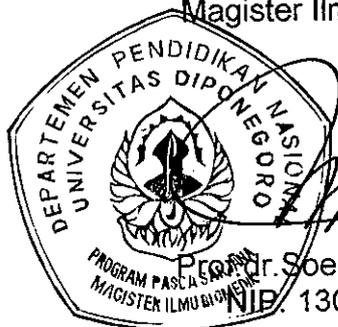
Pembimbing Utama

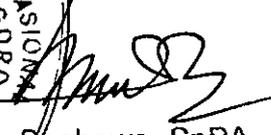
Prof. Dr. dr. Sarjadi, SpPA.  
NIP. 130 352 547

Pembimbing Kedua

dr. Edi Dharmana, MSc.  
NIP. 130 529 451

Ketua Program Studi  
Magister Ilmu Biomedik



  
dr. Soebowo, SpPA.  
NIP. 130 352 549

Telah diuji pada  
Tanggal 5 Oktober 2001

---

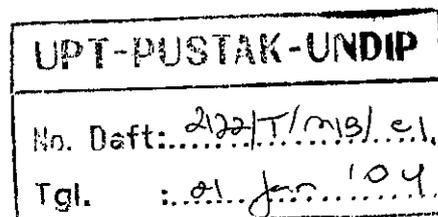
Surat Keputusan Direktur Program Pasca Sarjana Universitas  
Diponegoro Semarang Nomor : 235 / SK / J07.4 / 2001

### PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof.Dr.dr.Sarjadi, SpPA

Anggota :

1. dr.Edi Dharmana, MSc
2. Prof Dr.dr.Tjahjono, SpPA, FIAC
3. dr.Wahyu Rochadi, MSc.
4. dr.Sujoto, SpKK
5. Prof.dr.Nurdjaman
6. Prof Dr.dr. Ig. Riwanto, SpBD



## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan didalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum / tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, 5 Oktober 2001

Ika Pawitra Miranti

## RIWAYAT HIDUP

Nama lengkap : Ika Pawitra Miranti, dr.  
 Tempat & Tgl.Lahir : Jakarta, 17 Juni 1962  
 Pangkat / Golongan : Penata Muda Tk.I / III-b  
 NIP : 131 875 465  
 Jabatan pokok : Asisten Ahli / Dosen Bag. Patologi Anatomi FK UNDIP  
 Alamat rumah : Jl. Sisingamangaraja 24 / 54 Semarang  
 Alamat kantor : Jl.dr.Sutomo 18 Semarang.

## RIWAYAT PENDIDIKAN

Pendidikan Dasar	: Sekolah Dasar	1969-1974
	Sekolah Menengah Pertama	1975-1977
	Sekolah Menengah Atas	1978-1981
Pendidikan Dokter	: Fakultas Kedokteran UNDIP	1982-1989

## Pendidikan Pascasarjana

1. Mengikuti Penetaran dan Lokakarya Belajar Mengajar, Bag.IKM FK UNDIP Semarang 1990.
2. Mengikuti Kursus Singkat Diagnosis dan Penatalaksanaan Melanoma Maligna dan Tumor Ganas Epidermal, Bag.Patologi Anatomik FKUI, Jakarta 1990.
3. Mengikuti Kursus Singkat Pemeriksaan Imunohistokimia, Bag Patologi Anatomik FKUI Jakarta 1991.
4. Mengikuti Penataran Dosen Wali di UNDIP Semarang, 1992
5. Mengikuti Penataran Applied Approach untuk pendidikan di UNDIP Semarang 1995.
6. Sedang mengikuti pendidikan Magister Ilmu Biomedik di UNDIP Semarang 1997- sekarang.
7. Mengikuti Lokakarya Teknik Mutakhir Penatalaksanaan Kanker di Bag. Patologi Anatomik FKUI 1998
8. Mengikuti Kuliah Defisiensi Biologi Molekuler dan Imunologi, FK -PAU UGM Yogyakarta 2000.
9. Mengikuti Courses on Basic Immunology for Diagnosis of Infectious & Non Infectious Diseases (Cancer, FK UGM-PAU UGM-Instituut Oncologie Vrije Universiteit di Yogyakarta 2000.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur yang tidak henti-hentinya saya panjatkan kepada Allah yang Maha Kuasa karena atas kehendaknya karya akhir ini dapat diselesaikan. Menganut prinsip lebih baik mencegah daripada mengobati, khususnya untuk penyakit kanker merupakan latar belakang pengambilan judul tesis ini, dengan penggunaan DNCB yang mudah pemakaiannya sebagai imunostimulan untuk mencegah kanker kulit. Pada kesempatan ini, saya ingin menghaturkan banyak terima kasih dan penghormatan yang setinggi-tingginya kepada :

Prof.Dr.dr.Sarjadi, SpPA. sebagai pembimbing utama tesis yang mendorong saya agar selalu memanfaatkan waktu untuk membuat penelitian yang bermutu sejak saya masuk menjadi staf pengajar sampai selesainya karya tulis ini.

dr.Edi Dharmana, MSc. sebagai pembimbing imunologi yang dengan segala kerendahan hatinya berkenan membimbing saya dalam menerapkan imunohistokimia.

Prof. Dr.dr.Tjahjono, SpPA, FIAC. sebagai Ketua Bagian Patologi Anatomi saat saya mulai mengambil program Magister ini, Ketua Program Magister Biomedik PPS UNDIP pertama, dan narasumber , yang di sela-sela kesibukan beliau, tidak henti-hentinya selalu mendorong saya untuk menyelesaikan karya tulis ini.

Prof.dr.Soebowo, SpPA. sebagai Ketua Program Magister Biomedik PPS UNDIP sekarang yang masih berkenan menerima dan membantu saya untuk melanjutkan program pendidikan ini.

Prof.dr.Nurdjaman sebagai narasumber dalam bidang prosesi jaringan dan penelitian binatang coba.

dr.Sujoto, SpKK. sebagai narasumber dan penguji dalam bidang histologi kulit yang merupakan salah satu sasaran utama dalam karya tulis ini.

dr.Wahyu Rochadi, MSc. sebagai narasumber statistik yang besar pengaruhnya untuk mengambil kesimpulan hasil penelitian yang dikerjakan disini.

Prof.Dr.dr.Ign Riwanto, SpBD sebagai narasumber dalam bidang metodologi penelitian, dan Ketua Lembaga Penelitian UNDIP yang memberi kesempatan kepada saya untuk mendapatkan dana penelitian Dosen Muda..

Prof.Dr.dr.Sutoto, SpOG (alm) yang berkenan memberi masukan untuk perbaikan tesis ini.

Bapak Rektor Universitas Diponegoro dan Bapak Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP yang telah mengizinkan saya untuk mengikuti pendidikan program Magister ini.

dr.Kasno, SpPA. sebagai Ketua Bagian Patologi Anatomi FK UNDIP dan para teknisi Bag.PA FK UNDIP / RSUP dr.Kariadi yang mengizinkan saya menggunakan sarana penelitian yang dibutuhkan dalam karya tulis ini.

Dr.dr. Sultana MH Faradz, MSc., yang di sela-sela kesibukannya di Australia telah membantu saya menyiapkan sarana untuk pewarnaan imunohistokimia.

Dr. Prijono Tirtoprodjo SpPA, Dr.Harijadi SpPA, dr.Irianiwati SpPA, dan para teknisi dari Bagian Patologi Anatomi FK UGM / RSUP dr.Sarjito yang telah mengizinkan dan membantu saya belajar pewarnaan imunohistokimia di Yogyakarta.

Para dosen program Magister Biomedik PPS UNDIP yang telah memperkaya wawasan saya mengenai Bioteknologi, Biomolekululer dan penerapannya dalam penelitian.

dr.Udadi Sadhana Mkes, dr.Awal Prasetyo, dr.Indra Wijaya SpPA, dr. Noor Yazid SpPA, Dr.dr.HM Rofiq Anwar SpPA, dr.Amarwati SpPA, dr.Bambang Endro Putranto SpPA, dr.Sumarijanto SpPA (alm), dr.HJ Sutoto SpPA, dan adik-adik residen Bag.Patologi Anatomi FK UNDIP yang ikut memperlancar saya dalam mengikuti program pendidikan ini dengan menciptakan suasana kerja yang menyenangkan.

Para rekan sejawat peserta program Magister Biomedik PPS UNDIP atas kerjasama yang kuat selama ini.

Bapak, almarhumah Ibu, suami dan anak-anakku tercinta yang selalu mengingatkan untuk tidak melupakan tugas saya sebagai seorang anak, istri ibu, dan pekerja yang harus selalu menyelesaikan tugasnya dengan baik.

Saya memohon ma'af yang sebesar-besarnya atas tindak-tanduk saya yang kurang berkenan selama ini dan juga selalu memohon dukungannya untuk meneruskan penelitian dalam tesis ini .

Ika Pawitra Miranti

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
ABSTRAK .....	xiii
<b>Bab 1 : PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan penelitian .....	3
1.4. Manfaat penelitian .....	4
<b>Bab 2 : TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Respon imun seluler pada kulit .....	5
2.2. Karsinogenesis kanker kulit .....	6
2.3. Peran sel efektor imun pada sel kanker .....	9
2.4. Imunoterapi DNCB pada kanker kulit .....	11
2.5. Kerangka teori .....	14
<b>Bab 3 : KERANGKA KONSEPTUAL &amp; HIPOTESIS</b>	
3.1. Kerangka konseptual .....	15
3.2. Hipotesis .....	16
<b>Bab 4 : METODE PENELITIAN</b>	
4.1. Rancangan penelitian .....	17
4.2. Jenis dan besar sampel .....	17
4.3. Variabel penelitian .....	18
4.4. Bahan & alat penelitian .....	19
4.5. Cara kerja .....	20
4.6. Tempat penelitian .....	23
4.7. Cara pengumpulan data .....	23
4.8. Analisis data .....	23
<b>Bab 5 : HASIL PENELITIAN</b>	
5.1. Sebaran limfosit intradermal .....	25
5.2. Perubahan epiderrais .....	26
5.3. Korelasi Perubahan epidermis dan sebaran limfosit .....	31
5.4. Ekspresi perforin pada limfosit intradermal .....	32

Bab 6	: PEMBAHASAN	
	6.1. Sebaran limfosit dalam dermis.....	33
	6.2. Perubahan epidermis .....	36
	6.3. Perbandingan Perubahan epidermis dan sebaran limfosit .....	40
	6.4. Espresi perforin .....	42
Bab 7	: KESIMPULAN & SARAN	
	7.1. Kesimpulan .....	44
	7.2. Saran .....	45
Bab 8	: RINGKASAN .....	47
	DAFTAR PUSTAKA .....	49
	LAMPIRAN-LAMPIRAN .....	52

## DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1. : Cara pemberian DNCB & Ter pada kulit mencit	20
Tabel 2. : Pengelompokan variabel yang dianalisis	23
Tabel 3. : Perbedaan rata-rata skor sebaran limfosit	25
Tabel 4. : Perbedaan rata-rata skor perubahan epidermis	26
Tabel 5. : Distribusi frekuensi skor perubahan epidermis antar kelompok mencit.	27
Tabel 6. : Prosentase kejadian displasia pada paparan DNCB dan Ter	28
Tabel 7. : Prosentase kejadian displasia pada paparan Ter	29
Tabel 8. : Prosentase kejadian displasia pada paparan DNCB	29
Tabel 9. : Korelasi skor sebaran limfosit dan perubahan epidermis	31
Tabel 10.: Prosentase limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin (Pengamatan 10 lapang pandang, pembesaran 400x)	32

## DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1. : Perbedaan skor perubahan epidermis antar kelompok mencit	28
Gambar 2 : Perbandingan rata-rata skor epidermis dan sebaran limfosit pada semua kelompok mencit.	30
Gambar 3 : Korelasi perubahan epidermis dan sebaran limfosit pada semua kelompok mencit.	31
Gambar 4 : Perbandingan kekuatan karsinogenik dari berbagai macam HPA	37
Gambar 5 : Sinyal transduksi dari luar ke dalam sel	39

## DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lamp.1 : Skor sebaran limfosit dan perubahan epidermis antar kelompok	52
Lamp.2 : Distribusi skor sebaran limfosit dan perubahan epidermis dengan Kolmogorov-Smirnov <i>Goodness of Fit Test</i> .	53
Lamp.3 : Ilustrasi teknik pewarnaan imunohistokimia	54
Lamp 4 : Prosedur pewarnaan MoAb anti-Perforin	55
Lamp 5 : Hasil pengamatan limfosit dengan pewarnaan MoAb anti-Perforin	56
Lamp.6 : Gambaran mikroskopik perubahan epidermis dan sebaran limfosit dengan pewarnaan HE dan MoAb anti-perforin.	57

## ABSTRAK

DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) merupakan imunostimulan yang kuat meskipun hanya dipaparkan pada kulit. Berbagai penelitian menunjukkan DNCB menyebabkan terjadinya sebaran sel mononuklear dalam dermis, meningkatkan jumlah sel CTL dan sel NK, ekspresi TNF- $\alpha$ , dan produksi IFN- $\gamma$ . Untuk penyakit kanker, DNCB digunakan sebagai parameter defisiensi imun seluler. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa DNCB meningkatkan sebaran limfosit intradermal dan menimbulkan derajat perubahan neoplastik epidermis yang berbeda dengan Ter pada kulit mencit C3H.

Dengan metode penelitian *posttest-only randomized controlled group design*, 36 mencit dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol sehat. Kelompok perlakuan masing-masing diberi campuran DNCB-Ter ; Ter saja ; dan DNCB saja pada kulit punggung seluas 1,5 x 1,5 cm. DNCB 10 ug dalam aseton diteteskan sebelum pemberian Ter. Olesan Ter dilakukan sehari sekali selama 5 bulan. Pada akhir perlakuan, kulit dipotong dan dibagi menjadi 4 bagian yang sama kemudian diproses menjadi jaringan dalam parafin sehingga terkumpul 128 blok parafin. Setiap blok dipotong dan diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin untuk melihat perubahan epidermis dan sebaran limfosit intradermal masing-masing kelompok yang dinyatakan dalam skor. Beberapa blok yang menunjukkan displasia ringan dan berat dipotong dan diwarnai dengan antibodi monoklonal anti-Perforin untuk melihat perbedaan prosentase jumlah limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin. Analisis data memakai uji normalitas Kolmogorov-Smirnov *Goodness of Fit Test*, uji beda Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney, Uji Chi-square dan uji korelasi Spearman.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata skor perubahan epidermis pada 3 kelompok perlakuan tidak berbeda bermakna yaitu hiperplasia ringan. Distribusi frekuensi skor perubahan epidermis menunjukkan displasia ringan terjadi pada ketiga kelompok, sedangkan displasia berat hanya terjadi pada kelompok Ter dan campuran DNCB-Ter. Prosentase terjadinya displasia pada kelompok DNCB-Ter lebih rendah dibanding kelompok Ter. Risiko terjadinya displasia secara umum pada kelompok DNCB dan kelompok DNCB-Ter lebih rendah dibanding kelompok Ter. Kelompok yang terpapar DNCB-Ter menunjukkan rata-rata skor limfosit yang berbeda bermakna dengan kelompok lainnya, namun rata-rata skor sebaran limfosit untuk kedua kelompok yang masing-masing diberi DNCB saja dan Ter saja tidak berbeda bermakna. Korelasi antara skor perubahan epidermis dan sebaran limfosit menunjukkan arah positif dan kelompok yang diberi DNCB saja mempunyai koefisien korelasi paling tinggi. Prosentase jumlah limfosit dalam dermis yang mengekspresikan Perforin pada keadaan displasia ringan hampir sama, sebaliknya pada displasia berat / mikro-invasi, prosentase limfosit kelompok DNCB-Ter lebih tinggi dari kelompok yang terpapar Ter saja.

Kesimpulannya adalah DNCB dapat mencegah kanker kulit akibat paparan Ter, meningkatkan sebaran limfosit intradermal, dan meningkatkan prosentase limfosit yang mengekspresikan Perforin (CTL dan sel NK) pada keadaan displasia berat.

Kata kunci : DNCB, Ter, perubahan epidermis, limfosit intradermal.

## ABSTRACT

DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) is a strong immunostimulant, although it is only topically applied on the certain area of the skin. Many studies showed DNCB can cause not only infiltration of mononuclear cells within the dermis, but also increase the number of CTL and NK cell, the production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . In cancer, DNCB was used as a parameter of cellular immune deficiencies. Based on our preliminary study, we are going to prove that DNCB can increase intradermal lymphocyte infiltration and cause different grading of epidermal neoplastic changes with Tar on C3H-mouse skin.

Using the posttest-only randomized controlled group design, each of three experimental groups was applied with mixed DNCB- Tar ; DNCB only ; and Tar only on the 1,5x1,5 cm back area of the skin. DNCB 10  $\mu$ g in acetone was applied first, followed by tar application for 5 months. At the end of the experiment, the skin was cut, divided equally into 4 pieces and processed as a paraffin-embedded-tissue. Totally there were 128 paraffin blocks ready to be stained with Hematoxylin-Eosin. Some blocks that showing the same epidermal changes on the previous staining, were stained with monoclonal antibody anti-perforin to compare perforin expression in the lymphocyte cells in the dermis. All data were estimated in score and tested with Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit test, Kruskal-Wallis and Mann Whitney significance test, Chi-square test and Spearman correlation test.

The study showed that the mean score of epidermal changes of those 3 experimental groups were insignificantly different (mild hyperplasia). The distribution of the score showed that mild dysplasia was occurred on those 3 groups, but severe dysplasia occurred on the Tar-only and the DNCB-Tar group. The risk of dysplasia in general of DNCB-only and the DNCB-Tar group were lower than the Tar-only group. The lymphocyte mean score of DNCB-Tar group was higher than the other 3 groups. On the other hand, The mean score of lymphocyte infiltration of the two groups with DNCB-only and Tar-only were insignificantly different. The correlation between the two dependent variables was positive and the DNCB-only group had the highest coefficient score. The percentage of intradermal perforin-expressed lymphocytes showing mild dysplasia of the experimental group was almost the same, but on severe dysplasia / microinvasion, the percentage of perforin-expressed lymphocytes of the DNCB-Tar group was higher than the Tar-only group.

We conclude that DNCB can increase the intradermal lymphocyte infiltration, decrease the incidence of dysplasia as a first step of skin cancer, and increase the percentage of intradermal perforin-expressed lymphocytes on severe dysplasia.

Keywords : DNCB, Tar, intradermal lymphocyte, epidermal changes

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. LATAR BELAKANG MASALAH

DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) adalah bahan kimia yang digunakan sebagai imunostimulan seluler yang kuat dan secara tak langsung dapat dipakai sebagai salah satu cara untuk menanggulangi penyakit karena virus dan patogen lain<sup>(1,2)</sup>. Paparan DNCB pada kulit akan menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat (DTH) dengan sensitivitas yang menetap selama bertahun-tahun<sup>(3,4)</sup>. Reaksi DTH DNCB akan memperbaiki reaksi sel T secara umum dengan melibatkan inisiasi sel Th1 (*T helper-1*) dan meningkatkan jumlah sel CTL (*Cytotoxic T lymphocyte*)<sup>(5)</sup>. Penelitian Arts dkk (1996) menemukan bahwa paparan DNCB pada kulit telinga tikus menimbulkan penebalan kulit yang mengandung infiltrasi sel radang mononuklear (MN)<sup>(6)</sup>. Sel mononuklear yang terjadi disebut sel efektor imun yang terdiri dari sel CTL, sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag. Uji coba DNCB pada penderita HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) stadium dini menunjukkan peningkatan jumlah sel efektor imun, yang disertai penurunan replikasi virus<sup>(1,2)</sup>. DNCB juga berperan dalam menginduksi ekspresi TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alfa*) dan produksi IFN- $\gamma$  (*Interferon gama*)<sup>(7,8)</sup>. Pada penderita kanker, DNCB telah banyak digunakan sebagai sarana untuk mendeteksi defisiensi imun seluler<sup>(9)</sup>, namun belum ada penelitian yang mengamati DNCB untuk pencegahan kanker maupun penghambatan pertumbuhan kanker. Abbas (1997) berpendapat bahwa peningkatan respons sel CTL merupakan tujuan terapi anti tumor di masa yang akan datang<sup>(10)</sup>. Dengan mengacu berbagai temuan diatas, DNCB sebagai imunostimulan,

diasumsikan dapat meningkatkan respons sel CTL melalui jalur spesifik dan non spesifik, dan dapat dipakai untuk pencegahan dan pengobatan kanker stadium dini.

Karsinogenesis secara umum merupakan proses yang bertahap meliputi inisiasi, promosi dan progresi, dan penyebabnya adalah multifaktor<sup>(11-13)</sup>. Untuk mempelajari proses ini, banyak peneliti menggunakan karsinogenesis kimiawi pada binatang percobaan<sup>(13)</sup>. Bahan kimia siap pakai seperti Ter bila terpapar pada kulit setiap hari selama 5 bulan pada mencit C3H dapat menimbulkan kanker kulit yang terdeteksi secara mikroskopik<sup>(14)</sup>. Asumsi yang timbul adalah bahwa Ter yang mengandung karsinogen golongan hidrokarbon polisiklik aromatik (HPA) berperan sebagai inisiator sekaligus promotor dalam proses karsinogenesis kanker kulit. Abbas (1997) berpendapat bahwa penurunan respon imun tubuh dapat memacu timbulnya kanker kulit bila terpapar karsinogen kimia dalam waktu lama<sup>(10)</sup>. Respon imun ini sangat dibutuhkan dan dapat muncul sebagai sel MN yang mengelilingi sel atau kelompok sel kanker pada jenis kanker yang prognosinya baik<sup>(15)</sup>. Pada penelitian *in vitro*, sel kanker akan dibunuh oleh sel MN tersebut<sup>(3,10)</sup>. Bila jumlah dan fungsi sel MN tersebut ditingkatkan sebelum sel kanker timbul dan membelah menjadi banyak, diharapkan dapat menghambat perubahan sel normal menjadi kelompok sel kanker intraepitelial maupun invasif. Laporan Sarjadi (1990, 1992) tentang insidens kanker kulit dengan jenis histologik terbanyak adalah karsinoma epidermoid, makin mendorong dilakukannya penelitian ini<sup>(16,17)</sup>.

Berbagai keadaan diatas kiranya dapat dipelajari dan diterapkan dalam upaya pencegahan kanker kulit seperti yang dilaporkan oleh Sarjadi dkk (1993) dalam studi pendahuluannya pada mencit C3H<sup>(14)</sup>. Larutan DNCB dosis 10 mikrogram dalam aseton diteteskan pada kulit seluas 1,5 cm, dilanjutkan dengan olesan ter setiap hari

berturut-turut pada daerah kulit yang sama selama 5 bulan. Secara mikroskopik, pada kulit yang hanya diolesi ter telah timbul karsinoma epidermoid. Meskipun belum dapat diuji kebenarannya secara statistik dan pengamatan respon sel peronda imun yang terlibat dalam proses karsinogenesis belum dilakukan, penelitian terakhir ini memberi petunjuk bahwa karsinogenesis kanker kulit lebih lambat pada kelompok yang diberi DNCB<sup>(14)</sup>. Asumsi yang timbul, DNCB menghambat timbulnya kanker kulit karena telah terjadi peningkatan respon limfosit lokal. Sebelum membelah lebih lanjut, satu atau beberapa sel kanker akan dilawan oleh "bala tentara" sel imun yang telah meningkat jumlahnya setelah diberi DNCB. Untuk membuktikan asumsi tersebut, maka penelitian diatas akan dilanjutkan dengan membandingkan respon limfosit lokal dari 4 kelompok mencit yang diberi DNCB, tanpa DNCB, dengan dan tanpa ter. Sel efektor imun CTL dan sel NK terlihat melalui pewarnaan imunohistokimiawi dengan antibodi monoklonal anti perforin.

## 1.2. RUMUSAN MASALAH

Apakah sebaran limfosit dalam dermis yang terjadi pada hipersensitivitas tipe lambat setelah pemberian DNCB 10 mikrogram menghambat perubahan neoplastik epidermis kulit mencit C3H yang terpapar karsinogen ter ?

## 1.3. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum :

Membuktikan sebaran limfosit dalam dermis setelah pemberian DNCB 10 mikrogram dapat menghambat perubahan neoplastik epidermis kulit mencit C3H yang terpapar bahan karsinogen ter.

Tujuan khusus :

- Membandingkan sebaran limfosit dalam dermis antar kelompok yang diberi DNCB, tanpa DNCB, dengan dan tanpa ter.
- Membandingkan perubahan neoplastik epidermis antar kelompok. yang diberi DNCB, tanpa DNCB, dengan dan tanpa ter.
- Menunjukkan adanya perbedaan perbandingan sebaran limfosit dalam dermis dengan perubahan neoplastik epidermis yang terjadi pada kelompok yang diberi DNCB, tanpa DNCB, dengan dan tanpa ter.
- Menunjukkan adanya perbedaan ekspresi perforin dalam limfosit di daerah dermis pada epidermis yang mengalami displasia ringan dan berat pada kelompok yang diberi DNCB, tanpa DNCB, dan Ter.

#### 1.4. MANFAAT PENELITIAN

DNCB merupakan stimulan kuat sistim imun seluler. Bila peran DNCB dapat dibuktikan pada penelitian ini, maka akan mendorong munculnya penelitian DNCB sebagai imunostimulan untuk pencegahan timbulnya kanker kulit, dengan mengamati sel yang berperan dalam respon imun seperti sel penyaji antigen, makrofag, dan sitokin yang memperkuat atau menghambat aktivitas sel imun seperti  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-2$  (*Interleukin 2*),  $TGF-\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), dsb. Selain itu ekspresi molekul MHC (*Major Histocompatibility Complex*) perlu diamati sebagai salah satu penentu keberhasilan respon imun spesifik. Pada akhirnya nanti setelah dicobakan karsinogen virus dan radiasi, dan diteliti sampai ke tingkat sub seluler, dengan DNCB dapat digunakan sebagai alternatif pencegahan kanker kulit.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. RESPON IMUN SELULER PADA KULIT

Hipersensitivitas tipe lambat (DTH) merupakan respon imun seluler yang banyak terjadi di kulit yang menyebabkan aktivasi sel T dan sekresi sitokin<sup>(10)</sup>. Komponen seluler non spesifik seperti sel NK dan makrofag juga dapat terlibat dalam reaksi DTH. Timbulnya reaksi DTH melalui 2 fase, yaitu fase sensitisasi dan elisitasi<sup>(3,10,12)</sup>.

Fase sensitisasi dimulai saat suatu antigen terpapar pertama kali pada kulit. Sel Langerhans yang berada diantara sel epidermis akan berperan sebagai sel penyaji antigen (APC) kepada sel Th / CD4 (*Cluster of Differentiation*) dengan perantara molekul MHC kelas II. Untuk dapat menyajikan antigen pada sel Th, sel Langerhans harus bermigrasi dari epidermis melalui vasa limfatika ke kelenjar limfe regional, tempat sel Th diaktifkan. Di kelenjar limfe regional, sel Langerhans berubah menjadi sel dendritik interdigitata yang akan menyajikan antigen pada sel Th. Aktivasi sel Th ditandai dengan bertambahnya jumlah dan kemampuannya untuk menembus barier endotel. Satu sampai dua minggu setelah paparan pertama antigen, sel Th akan muncul pada daerah paparan antigen sebagai sel Th aktif dan sel T memori<sup>(19)</sup>.

Fase elisitasi dimulai dengan penyajian antigen yang sama (*challenge*) kepada sel Th / sel T memori yang terdapat dalam sirkulasi atau dermis. Bedanya dengan fase sensitisasi adalah infiltrasi limfosit dalam dermis pada fase ini lebih banyak dan waktunya lebih cepat (24-48 jam setelah paparan kedua). Limfosit bermigrasi keluar dan mengelilingi pembuluh darah sehingga berakumulasi dalam dermis. Sel

Th aktif akan melepas berbagai limfokin seperti IFN- $\gamma$ , IL-2 dan regulator makrofag (MAF, MIF, MCF) yang akan memperkuat fungsi sel sel efektor (CTL, makrofag dan sel NK) dalam menyalakan antigen dan sel asing. Makrofag akan membunuh antigen dengan metabolit oksigen, enzim lisosomal, TNF- $\alpha$  dan NO (*Nitric Oxide*) yang terkandung didalamnya. Sel T-CD8+ / CTL akan menyalakan antigen yang mengekspresikan molekul MHC kelas I. Efek sitolisis CTL adalah dengan melepas perforin dan *granzyme* yang juga terkandung dalam sel NK.

Respon imun pada kulit juga melibatkan IgA (Imunoglobulin A) dan Ig E. Limfosit B jarang terjadi di jaringan kulit. Tampaknya Ig A diproduksi oleh limfosit B yang diaktifkan di kelenjar limfe regional, kemudian dibawa ke kulit melalui sirkulasi. Ig E berperan dalam reaksi *IgE-mediated immediate hypersensitivity* oleh karena pelepasan mediator kimia dari mastosit dermal<sup>(10)</sup>.

## 2.2. KARSINOGENESIS KIMIAWI KANKER KULIT

Kanker terjadi karena tidak adanya keseimbangan dua sistim gen yang terdapat dalam sel normal, yaitu protoonkogen yang merangsang proliferasi DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) dan *Tumor Supressor Gen* (TSG) yang menghambat proliferasi DNA. Berbagai kanker akibat paparan karsinogen kimia mengandung onkogen yang mengalami mutasi titik, delesi dan ketidakaturan bahan genetik.<sup>(13)</sup> Perubahan pada gen yang terdiri dari rantai DNA, disebabkan oleh reaksi karsinogen dengan DNA tersebut.

Karsinogenesis secara umum merupakan proses yang multistep dan penyebabnya multifaktor. Selain virus dan radiasi, karsinogen kimia golongan hidrokarbon polisiklik aromatik (HPA), seperti DMBA (*7,12-dimethylbenz-*

*anthracene*) ; BAP (*benz(a)pyrene*) ; *3-methylcholanthrene* yang diperkirakan terkandung dalam ter, dapat memacu karsinogenesis secara tak langsung. Multistep terlihat jelas pada gambaran karsinogenesis kimiawi yang dimulai dari proses inisiasi, promosi, progresi dan metastasis<sup>(3,11-13)</sup>.

Selama proses inisiasi, target molekuler karsinogenesis adalah DNA dalam inti. Sebagai inisiator, sifat karsinogen HPA timbul setelah dimetabolisme menjadi bentuk yang sangat mutagenik dan lebih karsinogenik daripada hidrokarbon asalnya. Perubahan DNA yang terjadi bersifat non letal dan irrevesibel, sehingga sel normal berubah menjadi sel yang terinisiasi yang bukan merupakan sel tumor karena sifat pertumbuhannya tidak otonom. Dalam sel yang terinisiasi terjadi aktivasi gen. Onkogen terbanyak yang diisolasi dari kanker pada binatang pengerat adalah gen – *ras*. Mencit penderita papiloma dan karsinoma kulit karena karsinogen DMBA mengalami mutasi titik tunggal pada kodon 61 dari gen – *ras*nya. Kerusakan DNA yang terjadi disini tidak dapat diperbaiki lagi oleh sistim enzim (*DNA repair system*). Sel yang terinisiasi masih membutuhkan promotor untuk berubah menjadi sel pra neoplastik dan akhirnya sel neoplastik.

Tahap promosi ditandai dengan sel yang terinisiasi berubah menjadi sel tumor karena paparan bahan kimia yang tidak mampu menginduksi transformasi. Target utama promotor adalah membran sel. TPA (*12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetat*) merupakan agen promotor yang kuat untuk menginduksi kanker kulit pada mencit, karena akan mengaktifkan proses penghantaran sinyal dari luar sampai ke dalam inti sel. Selama promosi berlangsung, sel yang terinisiasi secara mikroskopik tampak sebagai sel yang mengalami displasia ringan, sedang, berat, dan kelompok sel kanker intraepitelial. Displasia merupakan kehilangan keseragaman bentuk sel

(pleiomorfik), ukuran sel lebih besar dari normal dengan inti hiperkromatik<sup>(12)</sup>. Pada tahap ini sel ganas hanya dapat teridentifikasi secara mikroskopik, berupa sel ganas yang terbatas intraepitelial<sup>(12,13)</sup>. Pada tahap progresi, benjolan neoplastik dapat terlihat secara kasat mata, yang secara mikroskopik biasanya sudah menembus membrana basalis.

Berbagai penelitian eksperimental yang mengarah pada kanker dengan memaparkan karsinogen kimia telah dilakukan. Paparan pertama tar arang sangat sitotoksik dan menyebabkan nekrosis jaringan pada manusia<sup>(20)</sup>. Nekrosis ini akan diikuti dengan proliferasi sel yang berlangsung lama, berlebihan dan tidak pernah berhenti<sup>(3)</sup>. Dengan analisis histiometrik, epidermis akan menipis setelah terpapar tar arang selama 8 minggu<sup>(20)</sup>. Penelitian pendahuluan (1993) menunjukkan hiperplasia ringan epidermis kulit mencit C3H yang terpapar ter setiap hari selama 3 bulan<sup>(13)</sup>. Paparan ter tersebut bila dilanjutkan sampai 5 bulan, dapat menimbulkan kanker kulit yang terdeteksi secara mikroskopik, yang berarti sel epidermis sudah mengalami transformasi neoplastik. Jenis kanker yang timbul adalah karsinoma epidermoid yang sudah invasif. Benjolan neoplastik pada mencit C3H ini muncul pada olesan ter selama 7 bulan. Menurut karsinogenesis kimia, ter disini mungkin berperan sebagai karsinogen lengkap, yaitu sebagai inisiator sekaligus promotor<sup>(12)</sup>. Kemungkinan lain adalah dalam ter terkandung campuran bahan kimia golongan HPA yang berperan sebagai inisiator, dan promotor seperti TPA. Paparan ter pada kulit akan menyebabkan sel epidermis mengalami mutasi somatik yang irrevesibel yang akhirnya berlanjut menjadi karsinoma epidermoid invasif, sehingga selama 5 bulan tersebut telah terjadi proses inisiasi, promosi dan progresi.

Sel kanker yang timbul karena karsinogen kimia akan mengekspresikan protein antigenik yang tidak diekspresikan atau diekspresikan dengan kadar yang rendah oleh sel normal <sup>(10)</sup>. Protein tersebut akan menentukan sifat imunogenik sel kanker untuk merangsang respon imun spesifik dan alami. Dua jenis protein tersebut yaitu TSA (*Tumor Specific Antigen*) dan TAA (*Tumor Associated Antigen*) <sup>(4,10)</sup>. TSA hanya ditemukan pada sel tumor yang selalu dianggap asing bagi sel efektor imun. TAA ditemukan pada sel tumor dan juga beberapa sel normal yang berbeda ekspresi antigennya secara kuantitatif dan kualitatif. Ekspresi TAA dapat sama atau tidak sama dengan jenis jaringan asal tumor.

Meskipun mempunyai protein imunogenik sebagai petanda sel, sangat sulit memperkirakan saat protein tersebut muncul dan dianggap asing oleh sel efektor imun. Sebaliknya, walaupun respon imun tubuh telah ditingkatkan ternyata tumor mempunyai cara untuk menghindar dari sel imun, misalnya produk sel tumor yang menekan respon imun anti tumor, gangguan ekspresi molekul MHC kelas I, mekanisme toleransi, dan sebagainya.

### 2.3. PERAN SEL EFEKTOR IMUN TERHADAP SEL KANKER

Keberhasilan sel efektor imun dalam membunuh sel kanker tergantung pada berbagai faktor seperti prosesi dan ekspresi molekul MHC, reseptor permukaan sel, dan sebagainya. Banyak jurnal mengemukakan peran CTL dan sel NK dalam pertumbuhan tumor <sup>(21,22)</sup>, sedangkan peran makrofag tampaknya terlihat melalui sitokin yang dihasilkannya (TNF- $\alpha$ ) <sup>(10)</sup>.

Sel T akan berespon membunuh sel kanker secara langsung dan tak langsung <sup>(10)</sup>. Secara langsung, mekanisme sitotoksik CTL adalah spesifik, yang berarti bahwa

sel kanker yang menjadi targetnya beserta antigen tumornya harus menampilkan molekul MHC kelas I. Abnormalitas molekul MHC ini banyak dijumpai pada sel ganas manusia <sup>(21)</sup>. CTL akan melepas limfotoksin yang akan membantunya menempel pada sel kanker <sup>(3)</sup>. Ekspresi molekul MHC kelas I ditingkatkan oleh TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  <sup>(10)</sup>. Secara tak langsung, sel Th aktif akan melepas limfokin yang mengaktifkan sel CTL dan sel NK seperti IFN- $\gamma$ . IL-2 yang juga dihasilkan oleh sel Th, merupakan faktor pertumbuhan utama untuk limfosit; merangsang sintesis limfokin lain dari sel T; merangsang pertumbuhan dan fungsi sitolitik sel NK; dan menginduksi sel NK untuk mensekresi IFN- $\gamma$  <sup>(10)</sup>.

Sel NK dan makrofag berperan sebagai sel efektor imun alami terhadap tumor sebagai agen asing tanpa sensitisasi. Molekul MHC kelas I dapat menghambat kemampuan sitolitik sel NK, sebaliknya bila ekspresi molekul ini pada sel target terganggu akan merangsang sel NK untuk membunuh sel tersebut <sup>(22)</sup>. Kemampuan sitolitik sel NK juga ditingkatkan oleh IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 dan IL-12. Ada sel tumor yang merangsang limfosit B untuk mensekresi antibodi yang dapat menyelubungi sel tumor untuk menghindar dari sel imun <sup>(10)</sup>. Sel NK dan makrofag akan membunuh sel tumor yang diselubungi antibodi dengan cara ADCC (*Antibody Dependent Cell Cytotoxicity*). Mekanisme ADCC oleh sel NK dan makrofag terjadi karena kedua sel tersebut mempunyai reseptor Fc- $\gamma$  imunoglobulin.

Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melepas granula eksositosis azurofilik <sup>(10)</sup>. Granula ini mengandung perforin, sitotoksin, serin esterase (*granzyme*) dan proteoglikan. Perforin menimbulkan lubang pada dinding sel tumor yang merupakan jalan masuk bagi molekul sitotoksik lainnya ke dalam sitoplasma dan inti sel. Pewarnaan imunoperoksidase dengan antibodi

monoklonal anti perforin dapat mengidentifikasi sel imun yang mempunyai sifat sitotoksik seperti CTL dan sel NK <sup>(23)</sup>. Proses sitolisis makrofag terhadap sel tumor tergantung pada TNF- $\alpha$  yang dihasilkannya. Ikatan TNF- $\alpha$  dengan reseptor pada permukaan sel kanker secara langsung akan menimbulkan keadaan toksik bagi sel kanker. Hal ini terjadi karena sel kanker tidak mampu memproduksi enzim superoksida dismutase. TNF- $\alpha$  secara efektif juga akan menyebabkan trombosis pembuluh darah yang mendarahi tumor.

Secara mikroskopik kelompok sel kanker dapat dikelilingi oleh sekumpulan sel mononuklear yang berperan dalam perondaan imun terhadap sel kanker yang terbukti secara *in vitro* dapat membunuh sel kanker disekitarnya <sup>(3,10)</sup>. Infiltrasi limfosit pada beberapa tumor (TIL) menunjukkan prognosis yang lebih baik daripada tanpa infiltrasi, seperti pada karsinoma epidermoid epidermoid serviks uteri <sup>(10,15)</sup>. Limfosit yang timbul diantara karsinoma serviks terutama adalah CTL/CD8+, sehingga melibatkan molekul MHC kelas I.

#### 2.4. IMUNOTERAPI DNCB PADA KANKER KULIT KARENA KARSINOGEN KIMIA.

Melalui hipersensitivitas tipe lambat, DNCB akan memperbaiki respon sel T secara umum. Sensitivitas yang timbul akan menetap selama bertahun-tahun <sup>(4)</sup>. Untuk menimbulkan respons DTH DNCB, cara yang sering dilakukan adalah dengan meneteskan larutan DNCB dalam aseton pada kulit dengan luas daerah tertentu <sup>(4,5)</sup>.

Setelah terpapar pertama kali (sensitisasi), DNCB akan berubah bentuk menjadi hapten yaitu dinitrofenil. Supaya dapat menimbulkan respons imun, dinitrofenil harus berikatan dengan protein kulit menjadi kompleks dinitrofenil-

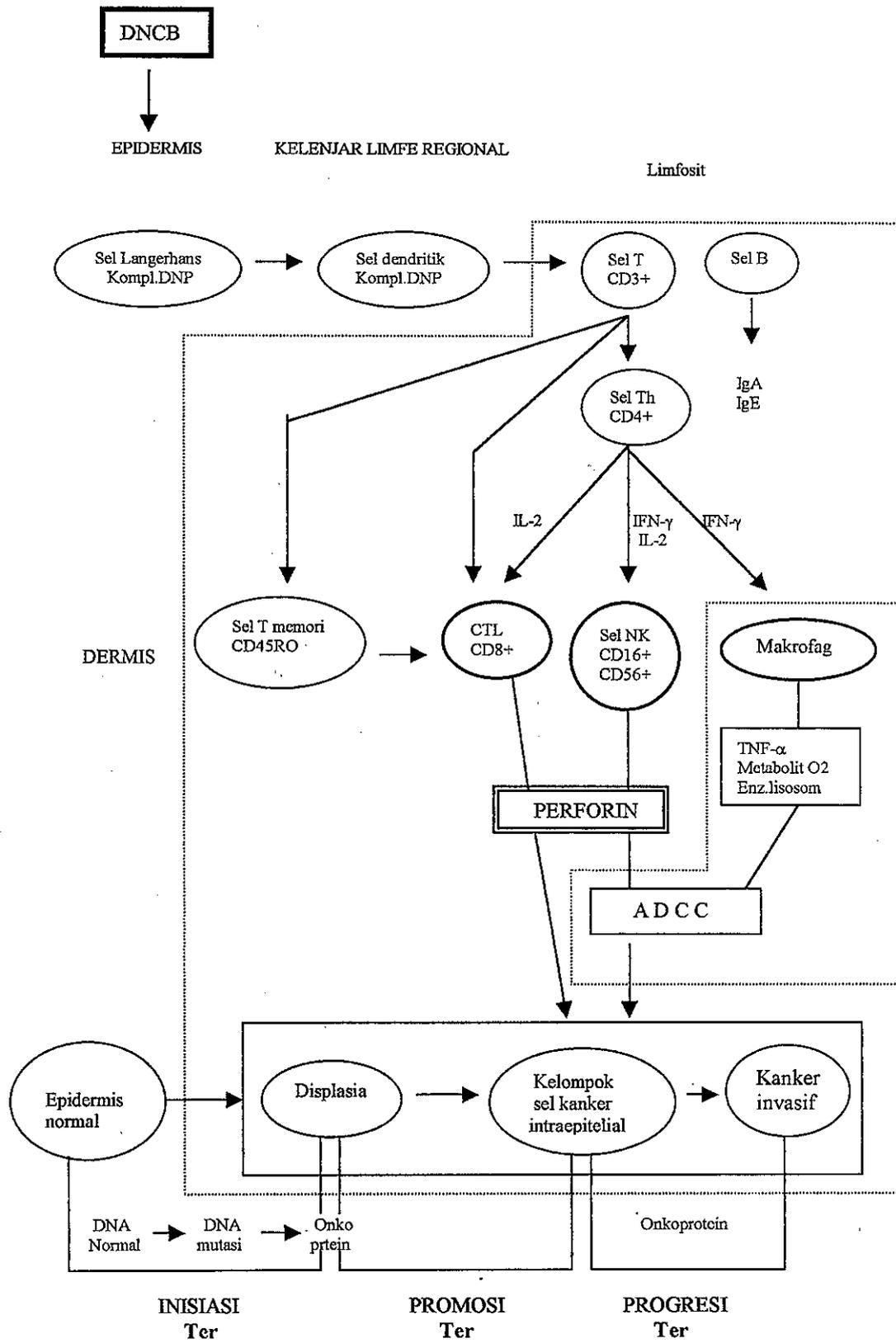
protein (DNP) yang akan disajikan oleh sel Langerhans / dendritik interdigitata ke sel Th dalam kelenjar limfe regional dengan perantara molekul MHC-II. Sel Th akan berproliferasi dan mengaktifkan sel efektor. Sensitisasi DNCB juga menimbulkan sel T memori yang bersama sel T lainnya bergabung dan berkumpul di daerah paparan tadi. Seluruh proses sensitisasi berlangsung 10-14 hari <sup>(7,24)</sup>. Dearman (1996) dalam penelitiannya menemukan konsentrasi tinggi IFN- $\gamma$  pada sel T-CD4 dengan pengukuran ELISA terjadi 13 hari setelah paparan DNCB pada kulit mencit <sup>(7)</sup>.

Respon DTH DNCB akan muncul 48-72 jam setelah dipaparkan ulang (elisisasi) pada daerah yang sama. Reaksi yang timbul berupa infiltrat seluler dalam dermis <sup>(3)</sup>. Pada fase ini, sel T memori akan teraktivasi dan menginisiasi respon sistemik terhadap DNCB <sup>(5)</sup>. Semakin sering terpapar DNCB, respon yang timbul lebih cepat, lebih kuat karena banyaknya jumlah sel T memori dalam sirkulasi yang akan aktif menembus dinding endotel pembuluh darah untuk melenyapkan sel yang dianggap asing di daerah dermis. Pengaruh DNCB terhadap sitokin lain, selain merangsang ekspresi TNF- $\alpha$  pada kulit dengan pemeriksaan *Bioassay*, belum banyak dikemukakan oleh para peneliti. Reaksi infiltrat seluler dalam dermis tadi sudah cukup menunjukkan bahwa proliferasi sel T juga diikuti dengan peningkatan kadar sitokin lain seperti IL-2, IL-12, perforin dan sebagainya,

Uji coba DNCB sebagai imunomodulator pada penyakit HIV kiranya dapat diterapkan untuk pencegahan pengobatan penyakit kanker. Efek imunomodulator DNCB pada penyakit HIV dapat menurunkan replikasi virus sehingga aman untuk diberikan pada stadium dini <sup>(1)</sup>. Jumlah sel T-CD4 tetap stabil pada pemakaian ulang DNCB, jumlah sel T-CD8 dan sel NK meningkat secara signifikan setelah sensitisasi

DNCB, yang disertai penurunan replikasi virus berdasarkan penghitungan kadar RNA HIV serum. Penelitian klinik penyakit HIV di Brazil juga menunjukkan peningkatan jumlah sel T-CD4 dan T-CD8 pada kelompok DNCB <sup>(2)</sup>. Pemberian DNCB pada kulit punggung mencit C3H sebelum diolesi karsinogen ter menunjukkan adanya sebukan limfosit yang lebih banyak dibanding kelompok kontrol yang hanya terpapar ter <sup>(16)</sup>. Karsinoma epidermoid timbul secara mikroskopik pada kelompok kontrol yang terpapar ter setiap hari selama 5 bulan, sementara pada kelompok DNCB terjadi setelah terpapar ter selama 7 bulan. Meskipun kebenarannya belum dapat dianalisis secara statistik dan belum dicantumkan variabel bebas lainnya, hasil penelitian ini memberi petunjuk adanya upaya penghambatan terjadinya kanker kulit pada kelompok DNCB. Penelitian ini juga belum memaparkan DNCB sesuai induksi hipersensitivitas tipe lambat seperti yang dianjurkan oleh Goldberg (1993) mengingat mencit C3H ini belum pernah terpapar DNCB. Sebukan limfosit pada kelompok DNCB belum diketahui kemampuannya dalam menghadapi sel kanker, mengingat munculnya sel kanker sendiri juga dapat merangsang munculnya sebukan limfosit.

## 2.5. KERANGKA TEORI



## BAB 3

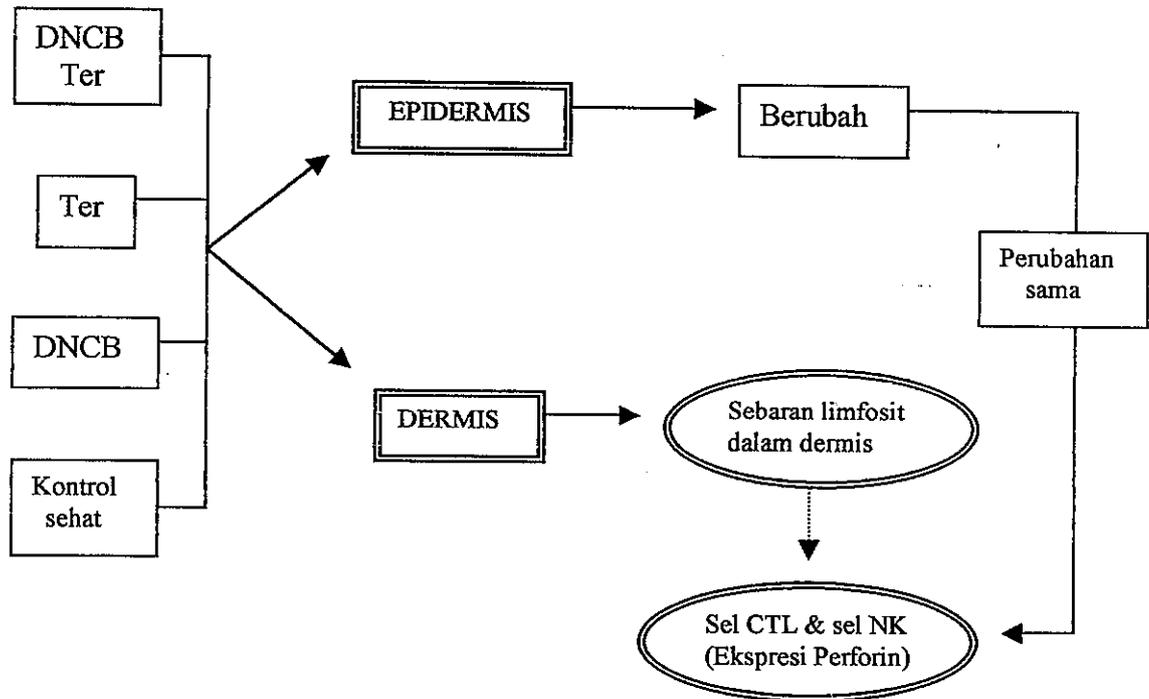
### KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

#### 3.1. KERANGKA KONSEPTUAL

Setelah DNCB terpapar pada kulit melalui tahap sensitisasi dan elisitasi, akan timbul sebaran limfosit dalam dermis sebagai reaksi terhadap DNCB. Dengan pemikiran bahwa respon limfosit lokal merupakan indikator prognostik kanker diharapkan limfosit yang timbul setelah pemberian DNCB dapat berperan sebagai sel peronda imun untuk menghambat perubahan epidermis normal menjadi kanker intraepitelial sampai invasif yang ditimbulkan oleh Ter yang diberikan setelah pemberian DNCB. Ter sebagai benda asing juga akan menimbulkan sebaran limfosit dalam dermis saat perubahan neoplastik epidermis dimulai. Dengan membandingkan luasnya sebaran limfosit dan perubahan epidermis akibat DNCB dan Ter ke dalam 3 kelompok perlakuan binatang percobaan, diharapkan dapat menjawab asumsi bahwa DNCB sebagai imunostimulan yang kuat dapat mencegah timbulnya kanker kulit akibat karsinogen Ter.

Pemeriksaan akurat untuk diagnosis kanker kulit adalah pemeriksaan histopatologik. Pertumbuhan epidermis menjadi kanker melibatkan komponen hiperplasia, proliferasi sel basal, displasia dan respon imun seluler. Respon limfosit yang berperan sebagai efektor imun adalah sel CTL dan sel NK. Salah satu cara untuk menentukan adanya kedua sel tersebut, adalah pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal anti-perforin. Dengan metode tersebut akan terlihat perforin yang dimaksud sekaligus perangsang histologik sel epidermis. Hasil dari pewarnaan tersebut adalah warna merah-kecoklatan dalam dermis yang berada di

dalam sel limfosit intradermal. Keberhasilan pewarnaan ini akan menunjukkan kedua sel yang bersifat sitotoksik tersebut. Sel mononuklear lain dan sel polinuklear tidak akan menampilkan warna tersebut.



### 3.2. HIPOTESIS

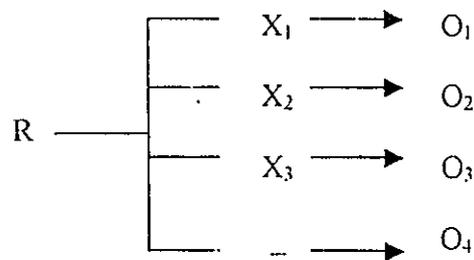
Peningkatan sebaran limfosit setelah pemberian DNCB dapat menghambat timbulnya kanker kulit akibat paparan Ter pada mencit C3H.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian ini menggunakan jenis eksperimental laboratorik dengan *posttest-only randomized control group design* pada hewan coba mencit.



#### 4.2. JENIS DAN BESAR SAMPEL

Mencit C3H jantan warna bulu agouti umur 3-4 bulan berat 15-20 gram, diperoleh dari laboratorium Patologi Anatomi FKUI. Penentuan besar sampel menurut rumus Federer, yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , ( $t$ ) adalah jumlah kelompok perlakuan dan ( $n$ ) adalah jumlah sampel per kelompok perlakuan. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan, sehingga didapat jumlah sampel minimal sebanyak 6 ekor per kelompok.

Kriteria inklusi :

- Berat badan 15-20 gram.
- Tidak didapatkan kelainan kulit.
- Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan tidak sakit.

Kriteria eksklusi :

- Berat badan kurang dari 15 gram

- b. Didapatkan kelainan kulit
- c. Selama observasi 7 hari sebelum perlakuan menderita sakit.
- d. Mencit mati selama perlakuan berlangsung (drop out)

#### 4.3. VARIABEL PENELITIAN

##### 4.3.1. Variabel tergantung

Definisi operasional :

Sebaran limfosit adalah semua sel limfosit dalam dermis dari potongan pertama masing-masing blok parafin yang dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x pada 5 lapang pandang dan dinyatakan dalam skor 0-s/d 5 limfosit ; 1-s/d  $\frac{1}{4}$  lapang pandang ; 2- s/d  $\frac{1}{2}$  lapang pandang ; 3- s/d  $> \frac{1}{2}$  lapang pandang <sup>(15)</sup>.

Perubahan epidermis adalah perubahan neoplastik epidermis mulai dari skor 0-normal ; 1-hiperplastik ringan ; 2-proliferasi sel basal ; 3-displasia ringan ; 4-displasia sedang dan 5-displasia berat/mikroinvasi pada potongan pertama masing-masing blok parafin, yang dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x pada 5 lapang pandang

Sel CTL dan sel NK adalah prosentase sel limfosit dalam dermis pada potongan kedua beberapa blok parafin yang menampakkan perubahan epidermis sama, yang dari hasil pewarnaan antibodi monoklonal anti-perforin dan dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, berwarna coklat.

##### 4.3.2. Variabel bebas adalah DNCB dan Ter.

#### 4.4. BAHAN DAN ALAT PENELITIAN

4.4.1. Bahan untuk perlakuan : - Larutan 10 mikrogram DNCB dalam aseton

- Bahan karsinogenik Ter (bahan bangunan)

4.4.2. Bahan untuk pemeriksaan histopatologi rutin

- a. Formalin buffer 10%
- b. Alkohol 50%, 70%, 80%, 96%, absolut.
- c. Xylool
- d. Parafin cair (*Histoplast*)
- e. Albumin dan *Poly-L-Lysine*
- f. Bahan pengecatan Hematoksin-Eosin (H-E)
- g. *Canada balsam* dan *Entelan*

4.4.3. Bahan tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase

- a. Antibodi primer : *Mouse Monoclonal Antibody (MoAb) anti-perforin*  
(Kamiya Biomedical Science cat.no. MC-030)
- b. Kit universal Streptavidin-Biotin (Labvision<sup>R</sup>)

4.4.4. Alat untuk pembuatan sediaan penelitian dengan pewarnaan H&E :

- a. Inkubator suhu 56 °C
- b. Mikrotom
- c. Kaca obyek dan kaca penutup

4.4.5. Alat tambahan untuk pewarnaan imunoperoksidase :

- a. Pensil PAP
- b. *Waterbath*
- c. Tempat pewarnaan dan pencucian
- d. *Timer*

sekali berturut-turut mulai hari ke 31 s/d 182 (5 bulan). Pada hari ke 183 semua mencit dibunuh dan kulit punggung yang menerima perlakuan dipotong untuk diteliti. Potongan kulit punggung tersebut dibagi menjadi 4 bagian yang sama dan diproses menjadi jaringan dalam blok parafin, sehingga didapatkan 128 blok parafin. Tiap blok dipotong setebal 6  $\mu$  dan diwarnai dengan Hematoksilin-Eosin, diperiksa dengan mikroskop cahaya.

#### 4.5.2. Cara pembuatan sediaan bahan penelitian

##### a. Fiksasi

Potongan kulit dimasukkan dalam larutan formalin bufer (larutan formalin 10% dalam Natrium asetat bufer sampai mencapai pH 7,0). Waktu fiksasi jaringan 18-24 jam. Setelah fiksasi selesai, dilakukan pemotongan jaringan menjadi 4 potongan sama besar, yang selanjutnya semua potongan dimasukkan dalam larutan akuades selama 1 jam untuk proses penghilangan larutan fiksasi.

##### b. Dehidrasi

Potongan kulit dimasukkan dalam alkohol konsentrasi bertingkat. Jaringan menjadi lebih jernih dan transparan. Jaringan kemudian dimasukkan dalam larutan alkohol-xylol selama 1 jam dan kemudian larutan xylol murni selama 2x2jam.

##### c. Impregnasi

Jaringan dimasukkan dalam parafin cair selama 2x2 jam.

d. *Embedding* (pengeraman)

Jaringan ditanam dalam parafin padat yang mempunyai titik lebur 56-58°C, ditunggu sampai parafin padat. Jaringan dalam parafin dipotong setebal 4 mikron dengan mikrotom. Potongan jaringan ditempelkan pada kaca obyekt yang sebelumnya telah diolesi polilisin sebagai perekat. Jaringan pada kaca obyekt dipanaskan dalam inkubator suhu 56-58 ° C sampai parafin mencair, kemudian didinginkan.

e. Pewarnaan jaringan dengan H&E

Secara berurutan jaringan pada kaca obyekt dimasukkan dalam :

1. Xylol I	5 menit	11. Alkohol 50%	3x2 menit
2. Xylol II	5 menit	12. Alkohol 70 %	
3. Alkohol bertingkat	3x2 menit	13. Eosin	
4. Aquadest	2 menit	14. Alkohol 70%	3 kali
5. HE Lillie-Mayer	5 menit	15. Carbol Xylol	
6. Air mengalir	2 menit	16. Xylol	3 kali
7. Alkohol asam 0,4%	3 celup	17. Xylol	20 menit
8. Air mengalir	2 menit	18. Canada balsam	
9. Lithium carbonat jenuh	3 celup	19. Tutup dengan kaca penutup.	
10. Air mengalir	2 menit		

f. Pewarnaan imunoperoksidase dengan Streptavidin–Biotin

Supaya dapat dilakukan pewarnaan dengan antibodi, jaringan harus terbebas dari parafin. Deparafinisasi mengikuti urutan seperti tersebut pada lampiran 2. Setelah diberi substrat kromogen, perforin yang terdapat dalam sitoplasma sel CTL dan sel NK akan berwarna merah kecoklatan.

#### 4.6. TEMPAT PENELITIAN

Perlakuan pada mencit sampai pembuatan blok parafin dan pewarnaan H&E dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UNDIP. Pewarnaan imunoperoksidase dilakukan di Laboratorium PA FK UGM / RSUP Dr.Sardjito.

#### 4.7. CARA PENGUMPULAN DATA

Setiap kulit mencit terbagi sama dalam 4 blok parafin sehingga terkumpul 128 blok parafin (Kel I - 32 blok, kel II - 36 blok, kel III - 28 blok, kel IV - 32 blok). Masing-masing blok dipotong 2 lapis setebal @ 6 mikron, diwarnai perforin dan H&E. Pewarnaan H&E untuk melihat skor perubahan epidermis dan sebaran limfosit dalam dermis. Pewarnaan perforin untuk melihat sel CTL dan sel NK yang berwarna coklat (sel CTL dan sel NK) pada daerah dermis.

#### 4.8. ANALISIS DATA

Setelah data terkumpul, dilakukan koreksi data dan pengelompokan data menjadi kelompok variabel tergantung dan variabel bebas sebagai berikut :

Tabel 2. Pengelompokan variabel yang dianalisis.

V. tergantung V. bebas	Perubahan epidermis	Sebaran limfosit	Prosentase limfosit yang berwarna coklat (Sel CTL dan sel NK)
Kel I : DNCB + Ter +			
Kel II : DNCB - Ter +			
Kel III : DNCB + Ter -			
Kel IV : DNCB - Ter -			

Dua potongan blok pertama, masing satu dari kelompok I ; II dan III, yang menampilkan perubahan epidermis berupa displasia ringan dengan pewarnaan H&E, dipotong kedua kalinya dan diwarnai dengan MoAb anti-Perforin yang selanjutnya dibandingkan prosentase sel limfosit dalam dermis yang mengekspresikan perforin (warna coklat). Untuk mengetahui pengaruh dan risiko DNCB dan Ter terhadap peningkatan sebaran limfosit dan perubahan epidermis, dan pengaruh peningkatan sebaran limfosit setelah pemberian DNCB terhadap perubahan epidermis, dilakukan uji normalitas data Kolmogorov-Smirnov, uji beda Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney, Chi-square, rasio odds serta uji korelasi Spearman, dengan  $p < 0,05$ .

## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

Bila kedua variabel tergantung diuji dengan Kolmogorov-Smirnov *Goodness of Fit Test* ternyata tidak menunjukkan kurva yang normal sehingga uji statistik yang dipakai adalah uji non parametrik (lampiran 2). Untuk menguji perbedaan rata-rata sebaran limfosit dan perubahan epidermis dari empat macam perlakuan dipakai Kruskal-Wallis *one way ANOVA*, sedangkan pengujian beda rata-rata amatan diatas antar kelompok memakai Mann Whitney U-Wilcoxon *Rank Sum W test*.

Tabel 3. Perbedaan rata-rata skor sebaran limfosit.

Kelompok Coba	n	Skor limfosit		%limfosit / LP		Rank Mean	Kruskal-Wallis nilai p	Mann Whitney )sig
		Mean	SD	Mean	SD			
I	32	0.90	0.45	22.5%	11.5%	92.5		* II, III, IV
II	36	0.60	0.40	15.0%	10.0%	70.4		* I, IV
III	28	0.53	0.29	13.3%	7.3%	65.8		* I, IV
IV	32	0.19	0.17	4.8%	4.3%	28.8		* I, II, III
Total	128	0.56	0.43	13.9%	10.8%		0.0000	

\*) kemaknaan antar 2 kelompok  
Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
Kel II : Ter  
Kel III : DNCB  
Kel IV : kontrol sehat

Rata-rata skor sebaran limfosit kelompok I adalah  $0.90 + 0.46$  atau  $22.5\% + 11.5\%$  per lapang pandang. Sedangkan rata-rata skor sebaran limfosit kelompok IV adalah yang paling kecil yaitu  $0.19 + 0.17$  atau  $4.8\% + 4.3\%$  per lapang pandang. Rata-

rata skor sebaran limfosit dari keempat kelompok tersebut diatas signifikan (nilai p Kruskal-Wallis  $<0.05$ ). Secara berpasangan menurut uji Mann Whitney, rata-rata limfosit kelompok I lebih tinggi secara bermakna dibanding kelompok II, III, IV. Demikian juga kelompok IV, rata-rata limfositnya paling rendah dibanding kelompok I, II, III. Kelompok II dan III rata-rata skor limfositnya tidak berbeda bermakna, namun kedua kelompok tersebut berbeda bermakna dengan kelompok I dan IV.

Tabel 4. Perbedaan rata-rata skor perubahan epidermis

Kelompok	Skor Perubahan epidermis		Mean Rank	Kruskal-Wallis nilai p	Mann Whitney *) sig
	Coba	n			
I	32	1.19	1.42	73.59	* IV
II	36	1.44	1.42	77.46	* IV
III	28	0.82	1.16	61.07	* IV
IV	32	0.22	0.42	43.83	I, II, III
Total	128	0.94	1.27		0.0002

Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
 Kel II : Ter  
 Kel III : DNCB  
 Kel IV : kontrol sehat

Rata-rata skor perubahan epidermis kelompok IV adalah  $0.22 + 0.42$  lebih kecil secara bermakna (nilai  $p < 0.05$ ) dibanding kelompok I, II, III. Rata-rata skor perubahan epidermis antar kelompok I, II dan III tidak berbeda bermakna.

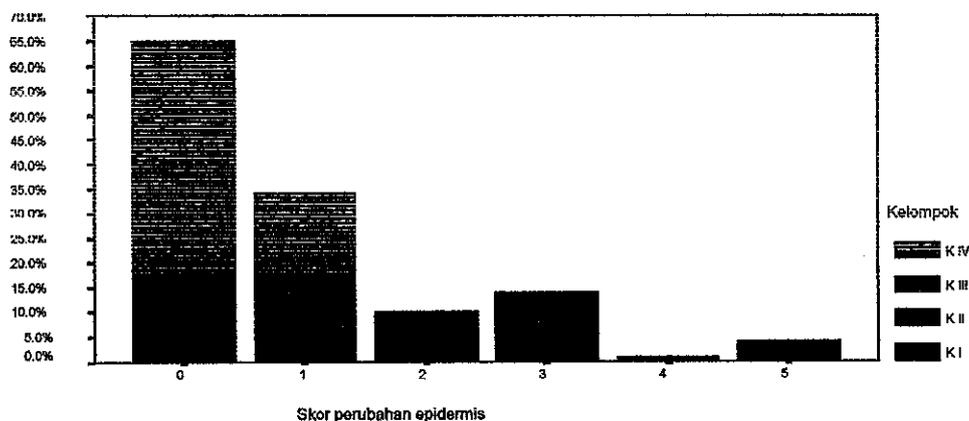
Tabel 5. Distribusi frekuensi skor perubahan epidermis antar kelompok mencit.

## Skor perubahan epidermis \* Kelompok Crosstabulation

			Kelompok				Total
			K I	K II	K III	K IV	
Skor perubahan epidermis	0	Count	10	14	16	25	65
		% within Kelompok	31.3%	38.9%	57.1%	78.1%	50.8%
	1	Count	16	5	6	7	34
		% within Kelompok	50.0%	13.9%	21.4%	21.9%	26.6%
	2	Count	2	7	1		10
		% within Kelompok	6.3%	19.4%	3.6%		7.8%
	3	Count	1	8	5		14
		% within Kelompok	3.1%	22.2%	17.9%		10.9%
	4	Count		1			1
		% within Kelompok		2.8%			.8%
	5	Count	3	1			4
		% within Kelompok	9.4%	2.8%			3.1%
Total	Count	32	36	28	32	128	
	% within Kelompok	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	

Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
 Kel II : Ter  
 Kel III : DNCB  
 Kel IV : kontrol sehat

Pada tabel 5 tampak displasia berat / mikroinvasi (skor 5) untuk kelompok I terjadi sebanyak 9,4% dan kelompok II 2,8% . Displasia ringan pada kelompok I sebanyak 3,1% dan kelompok II sebanyak 22,2%. Displasia sedang hanya terjadi pada kelompok II (2,8%). Bila prosentase kejadian displasia pada kedua kelompok tersebut ditotal (skor 3 s/d 5), untuk kelompok I adalah 12,5% dan kelompok II sebanyak 27,8%. Prosentase kejadian displasia ringan pada kelompok III adalah 17,9%.



Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
 Kel II : Ter  
 Kel III : DNCB  
 Kel IV : kontrol sehat

Gambar 1. Perbedaan skor perubahan epidermis antar kelompok mencit

Perbandingan prosentase skor perubahan epidermis juga dapat terlihat pada gambar 1 diatas. Kelompok II (hijau) mengalami displasia (skor 3 s/d 5) lebih banyak dibanding kelompok I dan III. Kelompok III (biru) juga mengalami displasia ringan (skor 3).

Tabel 6. Prosentase kejadian displasia pada paparan DNCB dan Ter

Paparan DNCB & Ter	DISPLASIA				Jumlah	
	Positif		Negatif		n	%
	n	%	n	%		
Positif	4	3,1	28	21,9	32	25,0
Negatif	15	11,7	81	63,3	96	75,0
Total	19	14,8	109	85,2	128	100,0

Chi-Square Yate's Correction = 0,0206 p = 0,886

OR = 0,77 (0,24, 2,52)

Mencit yang diberi paparan DNCB sebelum terpapar Ter selama 5 bulan, risiko terjadi displasia pada kulit adalah 0,77 kali lebih besar dibanding tidak diberi paparan sama sekali. Dengan kata lain paparan DNCB dan Ter dapat menghambat

displasia pada kulit mencit, meskipun kurang cukup bermakna secara statistik ( $p > 0,05$ )

Tabel 7. Prosentase kejadian displasia pada paparan ter.

Paparan ter	DISPLASIA				Jumlah	
	Positif		Negatif		n	%
	n	%	n	%		
Positif	10	7,8	26	20,3	36	28,1
Negatif	9	7,0	83	64,8	92	71,9
Total	19	14,8	109	85,2	128	100,0

Chi-Square Yate's Correction = 5,2816  $p = 0,022$

OR = 3,55 (1,30, 9,67)

Mencit yang terpapar ter selama 5 bulan, risiko terjadinya displasia pada kulitnya adalah 3,55 kali lebih besar dibanding apabila tidak terpapar ter. Risiko terjadinya displasia tersebut bermakna secara statistik ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian paparan Ter pada kulit mencit dapat menyebabkan terjadinya displasia.

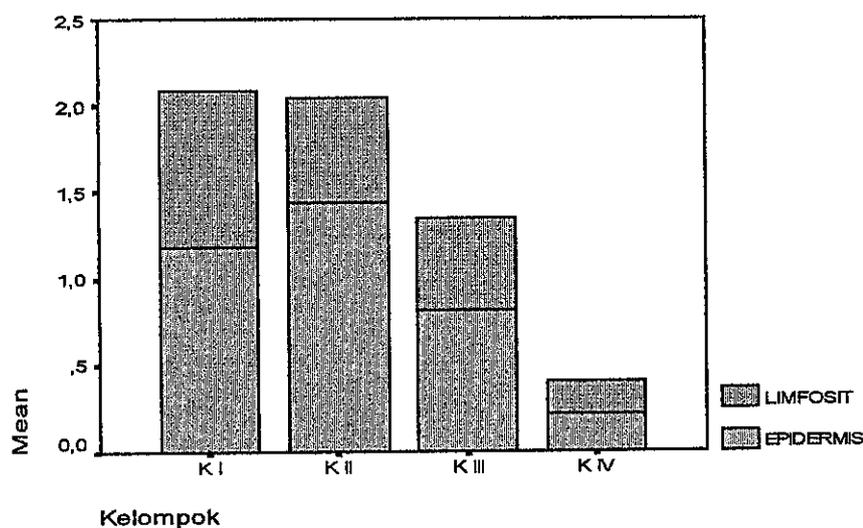
Tabel 8. Prosentase kejadian displasia pada paparan DNCB

Paparan DNCB	DISPLASIA				JUMLAH	
	Positif		Negatif		n	%
	n	%	n	%		
Positif	5	3,9	23	18,0	28	21,9
Negatif	14	10,9	86	67,2	100	78,1
Total	19	14,8	109	85,2	128	100,0

Chi-Square Yate's Correction = 0,0427  $p = 0,836$

OR = 1,33 (0,44, 4,09)

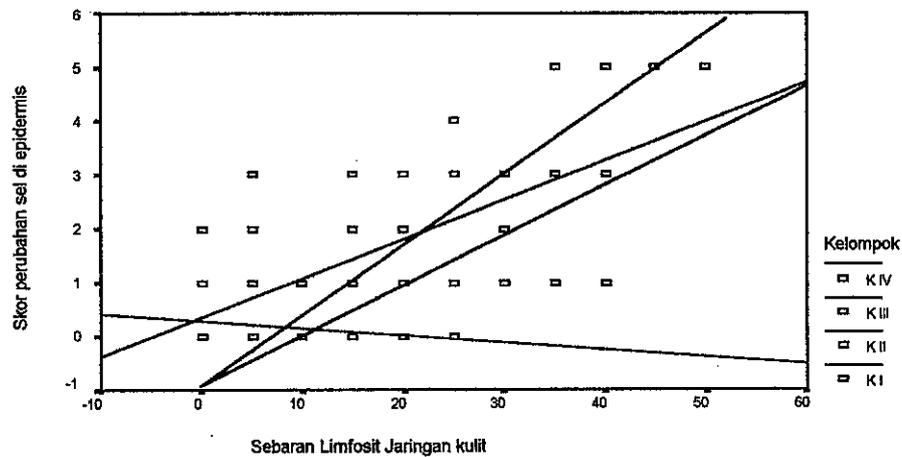
Risiko terjadinya displasia pada mencit yang terpapar DNCB adalah 1,33 kali lebih besar dibanding apabila tidak diberi DNCB. Namun demikian tidak bermakna secara statistik. ( $p > 0,05$ ). Dengan demikian meskipun DNCB dapat menyebabkan displasia pada kulit mencit yang terpapar DNCB, namun risiko tersebut sangat kecil.



Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
 Kel II : Ter  
 Kel III : DNCB  
 Kel IV : kontrol sehat

Gambar 2. Perbandingan rata-rata skor epidermis dan sebaran limfosit pada semua kelompok.

Bila kita lihat perbandingan rata-rata skor epidermis dan sebaran limfosit (gambar 2), tampak bahwa kelompok I mengalami perubahan epidermis lebih ringan namun dengan sebaran limfositnya lebih banyak dibanding kelompok II. Peningkatan limfosit ini juga tampak terjadi pada kelompok III yang disertai juga perubahan epidermis dengan skor lebih ringan.



Keterangan : Kel I : DNCB & Ter  
 Kel II : Ter  
 Kel III : DNCB  
 Kel IV : kontrol sehat

Gambar 3. Korelasi perubahan epidermis dan sebaran limfosit pada semua kelompok.

Tabel 9. Korelasi skor sebaran limfosit dan perubahan epidermis.

Skor limfosit	Skor perubahan epidermis				Total
	Kel I	Kel II	Kel III	Kel IV	
r	0.6503	0.4560	0.6916	- 0.2016	0.5244
n	32	36	28	32	128
Nilai p	0.0000	0.005	0.0000	0.269	0.000

Perhitungan koefisien korelasi Spearman ( $r$ ) menunjukkan ada korelasi positif (searah) antara skor sebaran limfosit dengan skor perubahan epidermis yang bermakna (nilai  $p < 0.05$ ) pada kelompok I, II, III dan seluruh kelompok (total). Ini berarti peningkatan jumlah limfosit mengarah ke perubahan epidermis menjadi kanker intraepitelial. Kekuatan korelasi perubahan epidermis dan sebaran limfosit pada kelompok yang diberi DNCB lebih nyata dibanding tanpa DNCB.

Tabel 10. Prosentase limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin.  
(pengamatan pada 10 lapang pandang dengan pembesaran 400x)

Limfosit intradermal	Displasia ringan			Displasia berat	
	Kel I	Kel II	Kel III	Kel I	Kel II
Perforin +	60,8%	75%	66,7%	82,8 %	51,4 %
Perforin -	39,2%	25%	33,3%	17,2 %	38,6 %
TOTAL	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Keterangan : Kel I : DNCB & Ter      Kel III : DNCB  
 Kel II : Ter                              Kel IV : Kontrol sehat

Prosentase limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin berupa displasia ringan (skor 3) pada kelompok II (75%) lebih tinggi dari kelompok I (60,8%) dan III (66,7%). Displasia berat / mikroinvasi (skor 5) menunjukkan bahwa prosentase limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin untuk kelompok I (82,8%) lebih besar dibanding kelompok II (51,5%).

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Dari awal sampai berakhirnya perlakuan, berat badan (BB) mencit berkurang namun masih memenuhi kriteria inklusi penelitian Rasa terbakar yang timbul karena paparan Ter dapat menyebabkan perubahan tingkah laku mencit jantan ini. Tikus yang mati ditemukan kepala sudah rusak, mungkin akibat saling berkelahi. Namun dengan BB, jenis mencit, jenis kelamin, umur, *inbred*, perlakuan kulit, dan pengamatan mikroskopik yang sama, maka perubahan variabel tergantung (sebaran limfosit dan perubahan epidermis) dianggap sama untuk semua kelompok mencit, dan keadaan yang berbeda dari masing-masing kelompok dianggap oleh karena perlakuan yang berbeda. Jumlah blok kulit mencit yang berbeda pada masing-masing kelompok, bila ingin dibandingkan satu sama lain, dapat dihitung perbedaannya dengan prosentase.

#### 6.1. SEBARAN LIMFOSIT DALAM DERMIS.

Pada tabel 3 tampak bahwa prosentase sebaran limfosit pada kelompok I (22,5%) berbeda bermakna dibanding kelompok II (15,0%), III (13,3%) dan IV (4,8%), disertai rata-rata skor kelompok I (0,90), II (0,60), III (0,53) dan IV (0,19). Meskipun rata-rata skor kelompok I mendekati 1 (sebaran limfosit s/d  $\frac{1}{4}$  lapang pandang), ini menunjukkan bahwa ada pengaruh DNCB dalam meningkatkan sebaran limfosit dalam dermis pada mencit yang terpapar Ter. Untuk kelompok II dan III, sebaran ini tidak berbeda bermakna yang menunjukkan bahwa baik paparan DNCB maupun Ter akan menimbulkan sebaran limfosit yang luas sebarannya hampir sama. Paparan DNCB pada kulit

dapat menimbulkan reaksi seluler spesifik DTH melalui 2 tahap yaitu sensitisasi dan elisitasi, dengan hasil akhir berupa timbulnya sebaran limfosit di daerah dermis <sup>(3,10,12,24)</sup>.

Proses sensitisasi melibatkan sel APC yang berada dalam epidermis, molekul MHC kelas II dan kelenjar limfe regional yang berisi sel Th dan sel CTL. Keberhasilan proses sensitisasi pada penelitian ini tidak dilihat karena antigen yang diteteskan tidak menimbulkan reaksi kemerahan maupun indurasi yang begitu nyata dibandingkan bila disuntikkan pada kulit. DNCB adalah suatu hapten yang tidak akan menimbulkan respon imun bila tidak berikatan dengan protein pembawa yaitu residu asam amino lysine <sup>(5)</sup>. Setelah berikatan, DNCB berubah menjadi kompleks DNP yang dianggap asing sehingga terjadilah fase rekognisi yang merupakan fase awal dari respon imun. Hasil akhir dari sensitisasi adalah terbentuknya sel T memori (Th dan CTL) pada daerah paparan antigen meskipun jumlahnya tidak sebanyak dalam lien. Pemeliharaan agar sel T memori tidak cepat hilang adalah sangat penting dan melibatkan berbagai faktor seperti cara paparan antigen, lamanya keberadaan antigen dalam kelenjar limfe regional, IL-15, komplemen, dsb <sup>(19)</sup>. Selama proses sensitisasi juga terjadi mekanisme pemrosesan antigen menjadi berikatan dengan molekul MHC. Proses ini sangat berpengaruh dalam pertumbuhan tumor. Data penelitian hewan percobaan menunjukkan bahwa defek MHC kelas I dan II berhubungan dengan transformasi maligna sel manusia sehingga menyebabkan terjadinya mekanisme penghindaran sel tumor agar tidak dikenali sel T <sup>(21)</sup>.

Proses elisitasi DNCB yang terlihat pada akhir penelitian ini untuk kelompok I dan III adalah proses yang sudah terjadi 5 bulan yang lalu saat mulai pemberian karsinogen Ter. Ternyata sebaran limfosit pada kelompok III (0,53

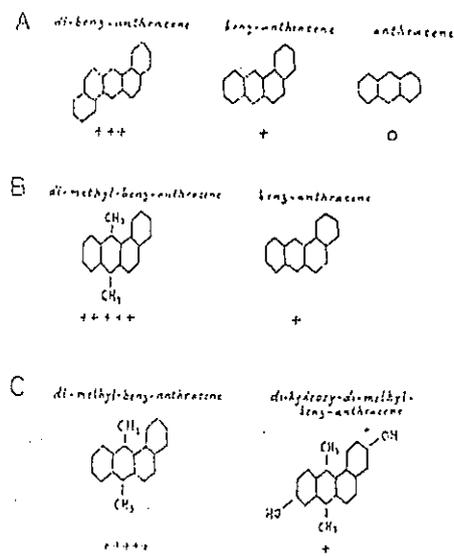
atau 13,3% ) sebagai hasil akhir elisitasi terlihat masih ada dan prosentasenya lebih tinggi daripada kelompok IV (0,19 atau 4,3%) meskipun dibandingkan dengan kelompok II (0,60 atau 15,0%) tidak berbeda bermakna. Hal ini dapat diasumsikan bahwa proses elisitasi sebanyak 4 kali sebelum paparan Ter masih dapat terlihat bedanya anatara kelompok I dan II serta kelompok III dan IV. Menurut Goldberg (1993) elisitasi DNCB ini dilakukan 1-2 minggu sekali untuk mempertahankan sebaran limfosit dalam dermis <sup>(24)</sup>. Bila elisitasi ini dilakukan pada kelompok I dan III tentunya akan timbul sebaran limfosit yang lebih nyata. Sebaran limfosit pada kelompok III akan lebih banyak secara bermakna dibanding kelompok II, dan kelompok I menjadi lebih luas lagi sebarannya. Selama tidak ada elisitasi yang kontinyu, limfosit akan lebih berada dalam aliran darah, yang perlu dibuktikan dengan pemeriksaan limfosit darah. Dari hasil pemeriksaan tersebut dapat diasumsikan bahwa jumlah limfosit darah kelompok I lebih banyak dibanding kelompok II, dan kelompok III lebih banyak dibanding kelompok IV. Limfosit ini akan keluar dari pembuluh darah bila antigen yang sama dipaparkan dan disajikan oleh sel endotel kapiler sebagai sel APC <sup>(10)</sup>. Pengamatan sel CTL dan sel NK dengan pewarnaan imunositokimia pada preparat hapus darah dengan antibodi monoklonal anti-perforin dapat dilakukan pada penelitian mendatang untuk mengetahui perbandingan jumlah sel CTL dan sel NK antar kelompok mencit tersebut.

Munculnya prosentase sebaran limfosit pada kelompok III yang lebih besar dibanding kelompok kontrol, sesuai dengan penelitian Arts et al (1996), Constantinides (1994) dan Cotran et al (1997). Sebaran limfosit ini semestinya juga diperiksa fungsinya dalam memproduksi limfokin supaya dapat dibandingkan dengan temuan peneliti lain yang mengemukakan produksi IFN- $\gamma$

dan  $\text{TNF-}\alpha$  <sup>(7,8)</sup>. Sebaran limfosit pada kelompok II tampaknya secara alami akan muncul sebagai reaksi terhadap paparan Ter yang lama sebagai bahan asing. Hal ini sulit dibandingkan dengan temuan penulis lain yang lebih mengamati perubahan epidermis daripada timbulnya sebaran limfosit pada paparan karsinogen <sup>(12,13,20)</sup>.

## 6.2. PERUBAHAN EPIDERMIS

Pada tabel 4 rata-rata skor perubahan epidermis kelompok I (1,19), II (1,44) dan III (0,82) berbeda bermakna dengan kelompok IV (0,22). Perubahan epidermis dari hasil perlakuan yang berbeda antara tiga kelompok perlakuan tidak berbeda bermakna, dan mendekati skor 1 (epidermis mengalami hiperplasia ringan). Pada tabel 5, kejadian displasia untuk kelompok II (27,8%) mempunyai prosentase 2 kali lebih besar dibanding kelompok I (12,5%) dan kelompok III (17,9%). Terjadinya displasia ringan pada kelompok III menunjukkan bahwa DNCB juga mampu menimbulkan perubahan neoplastik epidermis. Tabel 6,7,8 memuat data yang lebih menguatkan rendahnya sifat karsinogenik DNCB. Risiko terjadinya displasia antara kelompok DNCB (1,33 kali) lebih rendah daripada Ter (3,55 kali) bila masing-masing dibanding dengan kelompok kontrol. DNCB juga mampu menghambat terjadinya displasia pada kulit mencit akibat paparan Ter, meskipun kurang bermakna (OR=0,77).



Gambar 4. Perbandingan kekuatan karsinogenik dari berbagai macam HPA.  
(Diambil dari General Pathobiology by Constantinides P, 1994)

Rumus bangun kimia DNCB mempunyai inti *benzene* yang juga dipunyai oleh karsinogen kimia lainnya. Dibandingkan dengan DMBA (*dimethylbenz-anthracene*), DNCB mempunyai jumlah cincin *benzene* yang lebih sedikit sehingga mempunyai daya karsinogenik yang lebih rendah dibanding senyawa karsinogen lainnya<sup>(3)</sup>, apalagi bila dipakai dalam dosis rendah. Gambar 4 diatas menunjukkan bahwa adanya gugus metil dan makin banyak jumlah cincin *benzene*, makin kuat sifat karsinogeniknya. Namun dengan adanya gugus hidroksi, sifat karsinogeniknya lebih rendah daripada hanya ada gugus metil saja. DNCB tidak mempunyai gugus metil, namun mengandung gugus nitro pada inti *benzene* nya. Bila terpapar pada kulit, akan berubah menjadi nitrofenol<sup>(32)</sup> dengan munculnya gugus hidroksi pada inti *benzene* nya dan berubah sifatnya menjadi hapten<sup>(4)</sup>.

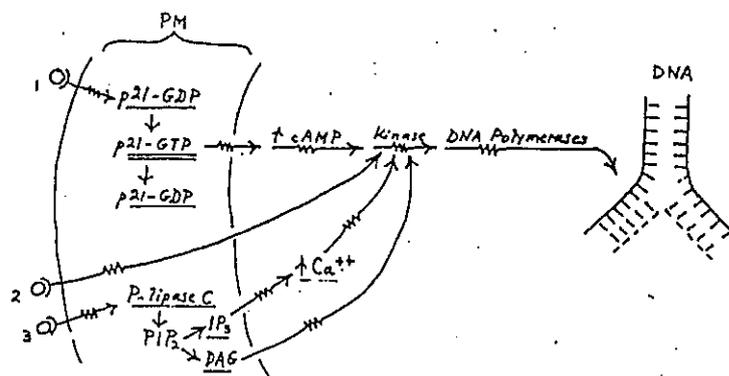
Terjadinya kanker kulit pada kelompok II (2,80%) dari penelitian ini bertentangan dengan penelitian pendahuluan Sarjadi dkk (1993) yang prosentase terjadinya lebih banyak<sup>(14)</sup>. Penelitian pendahuluan ini menganggap bahwa sampelnya adalah mencit, dan hanya menyimpulkan bahwa jumlah mencit yang

menderita kanker lebih banyak pada kelompok tanpa DNCB. Sedangkan sampel penelitian ini adalah blok kulit mencit yang terbagi masing-masing menjadi 4 bagian yang sama. Namun perbedaan hasil tadi sebenarnya dapat diterangkan secara rinci melalui proses molekuler terjadinya kanker dibawah ini.

Karsinogenesis adalah proses yang bertahap, meliputi inisiasi, promosi dan progresi yang dalam penelitian ini dilalui dengan pemaparan Ter pada kulit setiap hari selama 5 bulan. Gambaran histologik yang akan dialami mulai dari epidermis normal adalah epidermis menipis pada paparan tar arang selama 8 minggu <sup>(20)</sup>, diikuti hiperplasia ringan yang terbukti dalam penelitian Sarjadi (1993) muncul saat paparan Ter berjalan 3 bulan, dan terjadinya kelompok sel kanker invasif selama 5 bulan <sup>(14)</sup>. Tampaknya tahapan neoplastik yang dialami oleh mencit yang terpapar karsinogen Ter ini tidak sama padahal bahan Ter yang dioleskan sama dengan yang dipakai saat penelitian pendahuluan oleh Sarjadi (1993).

Ter mengandung senyawa HPA yang poten untuk menimbulkan kanker kulit <sup>(3,13)</sup>. Pada tahap inisiasi, HPA berubah bentuk menjadi bersifat elektrofilik mengandung sedikit elektron dan akan berikatan dengan molekul yang kaya elektron seperti protein dan asam nukleat (DNA) dalam inti sel. Peristiwa ini akan menyebabkan mutasi titik yang irreversibel pada gen - *ras* pada kodon 61. Mutasi ini harus terjadi terlebih dahulu sebelum menjadi kanker, dan ini dapat terdeteksi dengan teknik PCR (*Polymerized Chained Reaction*) untuk menggandakan DNA. Mutasi terlihat setelah hasil PCR tadi dimasukkan dalam gel elektroforesis dengan memakai standart (*probe*) dari gen -*ras* yang tidak mengalami mutasi. Hasil akhir dari tahap inisiasi adalah sel yang terinisiasi. Sel ini, seperti yang terjadi pada epidermis, secara fenotipik normal, namun genotipnya sudah mengalami mutasi.

Namun tidak dapat dipungkiri bahwa akhir dari proses inisiasi ini adalah sel yang genotipnya normal karena adanya *DNA repair system*.



Gambar 5. Sinyal transduksi dari luar ke dalam sel.

(Diambil dari General Pathobiology by Constantinides, 1994)

Tahap promosi pada penelitian ini juga masih dengan pemaparan Ter pada kulit yang akhirnya nanti dapat terjadi perubahan neoplastik sel epidermis berupa displasia ringan sampai karsinoma insitu. TPA merupakan bahan promotor yang pada tahap promosi merangsang proliferasi sel. Binatang pengerat dalam kulturnya terbukti mempunyai reseptor yang afinitasnya tinggi terhadap forbol dibutirat. Terjadinya ikatan antara TPA dengan reseptor forbol di membran sel akan mengaktifkan sinyal transduksi yang berakibat terjadinya ikatan antara diasilgliserol (DAG) dan protein kinase C (PKC) dengan hasil akhir rangsangan dimulainya replikasi DNA.

Dari perbedaan perubahan neoplastik pada akhir olesan Ter ini dapat diasumsikan bahwa telah terjadi perbedaan respon karsinogenesis pada tiap mencit. Perbedaan tersebut adalah saat terjadinya mutasi, DNA repair system, sistim sinyal transduksi pada masing-masing mencit. Penemuan yang terjadi dalam penelitian ini adalah bahwa campuran antara bahan inisiator dan promotor seperti yang terkandung menjadi satu dalam Ter, bila dipaparkan dalam waktu

lama, dapat menyebabkan kanker kulit tanpa harus diberikan inisiator dan promotor secara bertahap, yang menyebabkan inisiasi adalah inisiator yang sudah bercampur dengan promotor. Dalam kenyataannya sehari-hari, kita berhadapan dengan berbagai kemasan yang sudah mengandung campuran kedua bahan tersebut, tidak dalam bentuk DMBA, TPA, maupun metilksolantrin murni.

Displasia merupakan kehilangan keseragaman bentuk sel / pleiomofi, sel lebih besar, inti hiperkromatik, disertai mitosis abnormal yang dapat terjadi pada semua jaringan epitel, termasuk kulit <sup>(12)</sup>. Derajat displasia semakin berat bila mengenai seluruh tebal epidermis <sup>(33)</sup>. Melihat definisi displasia tersebut dapat diasumsikan bahwa pada displasia sudah terjadi replikasi aktif DNA, diikuti pembelahan inti yang cepat dan tidak sempat diikuti pembelahan membran inti dan membran sel sehingga ditemukan 2 nukleus dalam 1 sel yang digambarkan sebagai mitosis abnormal. Apakah displasia ringan ini reversibel? Menurut karsinogenesis, mutasi dalam sel displasia sifatnya ireversibel, sehingga muncul pernyataan bila displasia sifatnya reversibel maka pada tahap promosi juga ada mekanisme mirip DNA repair system atau terjadi apoptosis sel yang mengalami displasia.

### 6.3. PERBANDINGAN PERUBAHAN EPIDERMIS DAN SEBARAN LIMFOSIT

Skor perubahan epidermis dibanding skor sebaran limfosit terangkum dalam gambar 2. Tampak disini bahwa kelompok I mengalami perubahan epidermis yang lebih ringan namun dengan sebaran limfosit yang lebih nyata dibanding kelompok II. Hal ini menunjukkan bahwa DNCB dosis 10 mikrogram pada daerah 1,5x1,5 cm<sup>2</sup> dapat meningkatkan sebaran limfosit dan menghambat perubahan neoplastik epidermis. Perubahan epidermis pada kelompok II lebih

berat dibanding kelompok III. Hal ini memperkuat pernyataan bahwa daya karsinogenik DNCB lebih ringan dari Ter, meskipun keduanya menimbulkan sebaran limfosit yang tidak berbeda bermakna.

Timbulnya respon limfosit disini dapat menunjukkan bahwa proses pengenalan antigen, aktivasi dan efektor sel imun telah terjadi. Sel Th aktif melepas sitokin IL-2 dan IFN- $\gamma$ , ekspresi molekul MHC kelas I dan II dalam proses imun spesifik tidak diragukan lagi adanya, Sel CTL dan sel NK berkumpul bersama dengan sel Th dan sel efektor imun lainnya. Kedua sel efektor ini akan melepas perforin dan *granzyme* untuk membunuh sel targetnya yaitu sel tumor. Adanya perubahan epidermis yang lebih ringan pada kelompok I dibanding kelompok II menunjukkan bahwa telah terjadi pelepasan perforin oleh sel CTL dan sel NK karena antigen tumor dan ekspresi molekul MHC kelas I dan II ada dengan kadar yang cukup untuk dikenali limfosit T dan bila kadarnya kurang akan dihadapi oleh sel NK.

Timbulnya kanker pada kelompok I meskipun sudah diperkuat respon imunnya dengan DNCB sebelum terpapar Ter dapat diasumsikan bahwa telah terjadi defek pada mekanisme pemrosesan antigen. Perlu dilihat perbedaan ekspresi molekul MHC pada sel epidermis yang mengalami displasia ringan sampai berat, peran limfosit intraepidermal dalam merespon sel epidermis yang ekspresi molekul MHC tinggi. Limfosit intraepidermal ini mayoritas adalah sel CTL-CD8. Hubungannya dengan limfosit di dermis dalam memproduksi sitokinnnya masing-masing dan keterikatannya untuk saling membantu masih belum jelas<sup>(10)</sup>.

Hasil uji korelasi Spearmann menunjukkan bahwa ada korelasi positif (searah) antara skor sebaran limfosit dan skor perubahan epidermis (Gambar 3).

Ini berarti peningkatan jumlah limfosit mengarah ke perubahan epidermis menjadi kanker intraepitelial. Tabel 9 menunjukkan korelasi kedua skor tersebut lebih kuat pada kelompok yang diberi DNCB (kelompok I dan III) dan kelompok III adalah yang paling kuat hubungannya. Ini menunjukkan adanya efek samping DNCB walaupun prosentasenya hanya sedikit (17,9% - Tabel 5), dan risikonya sangat kecil untuk menimbulkan displasia (tabel 8). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini ada pengaruh DNCB dapat meningkatkan sebaran limfosit sesuai dengan peneliti terdahulu <sup>(1,2,5,6,7)</sup>.

#### 6.4. EKSPRESI PERFORIN

Dalam melakukan pewarnaan imunohistokimia diperlukan kontrol positif untuk membuktikan bahwa proses pewarnaan yang dilakukan telah berjalan dengan benar. Kontrol positif yang dipakai pada penelitian ini adalah kelenjar limfe manusia dan lien mencit percobaan. Pada gambar kelenjar limfe tampak bahwa sel berwarna coklat (yang mengekspresikan perforin) sedikit terlihat. Hal ini menunjukkan bahwa sel CTL dan sel NK yang aktif tidak begitu banyak. Sementara itu pewarnaan pada lien menunjukkan bahwa warna coklat mendominasi daerah para folikuler yang merupakan lokasi dari berkumpulnya sel T. Hasil pewarnaan pada kedua jaringan tersebut mengarahkan bahwa proses yang dilakukan pada penelitian ini sudah benar.

Kesulitan yang timbul adalah saat melihat ekspresi perforin ini pada jaringan kulit yang hampir semua bagian didominasi oleh substrat kromogen DAB yang berwarna coklat dengan intensitas warna yang berbeda-beda. Hasil konsultasi dengan Kawasaki yang telah berhasil melakukan pewarnaan ini <sup>(23)</sup>, adalah saran agar mencobanya pada jaringan segar seperti yang pernah dilakukan

di Bagian Imunologi FK Universitas Juntendo – Tokyo. Sebenarnya teknik pewarnaan ini juga dapat dilakukan pada jaringan blok parafin yang diproses dengan alkohol dan xylol pada suhu dibawah 60<sup>0</sup>C, dan ekspresi antigennya ditingkatkan dengan memasukkanya dalam oven *microwave*, yang semua cara tersebut sudah dilakukan dalam penelitian ini (lampiran 4)

Dengan berbagai keterbatasan, akhirnya diputuskan untuk menghitung limfosit yang berwarna coklat tebal untuk hasil perforin (+) seperti tercantum pada lampiran 5 dan prosentasenya pada tabel 10 untuk keadaan displasia ringan dan berat. Pada displasia ringan, ketiga kelompok perlakuan mempunyai prosentase sel yang mengekspresikan perforin hampir sama. Untuk displasia berat, kelompok I (82,8%) prosentasenya lebih tinggi dari kelompok II (51,4%). Meskipun tidak dilakukan pada semua blok kulit, hasil pewarnaan perforin menunjukkan bahwa DNCB meningkatkan prosentase jumlah sel CTL dan sel NK pada keadaan displasia berat, namun tidak begitu halnya pada displasia ringan. Asumsinya, pada displasia ringan belum terjadi peningkatan ekspresi MHC-I yang cukup untuk dikenali sel CTL, dan tidak dikenal oleh sel NK.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1. KESIMPULAN

Telah dilakukan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *posttest-only randomized control group* pada mencit C3H, menggunakan imunostimulan larutan DNCB 10 µg dalam aseton pada kulit dan Ter sebagai induktor kanker kulit. Variabel yang diamati adalah perubahan neoplastik epidermis dan sebaran limfosit dalam dermis yang dinyatakan dalam skor. Hasil yang ditemukan adalah :

1. DNCB maupun Ter mampu menimbulkan perubahan neoplastik epidermis (displasia), akan tetapi DNCB hanya menyebabkan displasia ringan (17,9%) sedangkan Ter mamppu menimbulkan displasia ringan, sedang dan berat (27,8%).
2. Displasia sedang terjadi pada kelompok paparan Ter tanpa DNCB (2,8%). Sedangkan displasia berat terjadi akibat paparan Ter baik dengan pemberian DNCB (9,4%) maupun tanpa DNCB (2,8%) sebelumnya.
3. Risiko terjadinya displasia akibat paparan Ter adalah 1,33 kali lebih besar dibanding tanpa paparan DNCB.
4. Risiko terjadinya displasia akibat paparan Ter adalah 3,55 kali lebih besar dibanding tanpa Ter.
5. Risiko terjadinya displasia akibat paparan DNCB-Ter adalah 0,77 kali lebih besar dibanding tanpa DNCB-Ter.

6. Ada perbedaan skor sebaran limfosit yang bermakna antara kelompok yang diberi DNCB dan tanpa DNCB.
7. Skor sebaran limfosit untuk kelompok yang diberi DNCB saja dan Ter saja tidak bermakna, tetapi kedua kelompok tersebut berbeda bermakna dengan kelompok yang diberi DNCB-Ter dan kelompok kontrol.
8. Perubahan epidermis normal menjadi kanker intraepitelial akan diikuti dengan peningkatan sebaran limfosit dalam dermis, dan kelompok yang diberi DNCB paling kuat korelasinya.
9. DNCB meningkatkan prosentase limfosit yang mengekspresikan Perforin (CTL dan Sel NK) pada displasia berat, namun tidak demikian halnya pada displasia ringan.

## 7.2. SARAN

Penelitian lanjutan yang perlu dilakukan adalah melihat hubungan atau korelasi sebaran limfosit intradermal seluruhnya dengan limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin. Limfosit intraepidermal yang selama ini belum jelas peran dan hubungannya dengan limfosit intraepidermal<sup>(10)</sup>, dapat diamati pada penelitian DNCB ini lebih lanjut. Kelenjar limfe dan lien yang merupakan gudang dari sel efektor imun, secara kuantitatif dapat dihitung jumlah masing-masing sel efektor imun dengan teknik pembuatan jaringan menjadi bahan yang terlarut. Penghitungan sel peronda imun secara kuantitatif ini, sebelum binatang coba dibunuh, harus diberi IL-2 sebagai pemicu proliferasi sel peronda imun. Penelitian DNCB lain yang berkaitan dengan kanker adalah pengamatan berbagai produk sel imun (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ,

TGF- $\beta$ ), molekul MHC, dengan teknik ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Assay*) dan imunohistokimia. Meskipun efek karsinogeniknya rendah, berbagai dosis DNCB perlu dibandingkan untuk menentukan dosis yang aman sebagai imunostimulan untuk mencegah kanker kulit akibat paparan Ter.

## BAB 8

### RINGKASAN

Paparan DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) pada kulit merupakan imuno-stimulan yang kuat. Berbagai penelitian menunjukkan DNCB menyebabkan terjadinya sekumpulan sel mononuklear dalam dermis, meningkatkan jumlah sel CTL dan sel NK, ekspresi TNF- $\alpha$ , dan produksi IFN- $\gamma$ . Untuk penyakit kanker, DNCB digunakan sebagai parameter defisiensi imun seluler. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan DNCB dapat menghambat pertumbuhan kanker kulit. Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa DNCB meningkatkan sebaran limfosit intradermal sehingga menimbulkan derajat perubahan neoplastik epidermis yang berbeda dengan Ter pada kulit mencit C3H.

Dengan metode penelitian *posttest-only randomized controlled group design*, 36 mencit dikelompokkan menjadi tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol sehat. Kelompok perlakuan masing-masing diberi campuran DNCB-Ter ; Ter saja ; dan DNCB saja pada kulit punggung seluas 1,5 x 1,5 cm. DNCB 10 ug dalam aseton diteteskan sebelum pemberian Ter. Olesan Ter dilakukan sehari sekali selama 5 bulan. Pada akhir perlakuan, kulit dipotong dan dibagi menjadi 4 bagian yang sama kemudian diproses menjadi jaringan dalam parafin sehingga terkumpul 128 blok parafin. Setiap blok dipotong dan diwarnai dengan Hematoksin-Eosin untuk melihat perubahan epidermis dan sebaran limfosit intradermal masing-masing kelompok yang dinyatakan dalam skor. Beberapa blok yang menunjukkan displasia ringan dan berat dipotong dan diwarnai dengan antibodi monoklonal anti-Perforin untuk melihat perbedaan prosentase jumlah limfosit intradermal yang mengekspresikan perforin. Analisis data memakai uji

normalitas Kolmogorov-Smirnov *Goodness of Fit Test*, uji beda Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney, Uji Chi-square dan uji korelasi Spearmann.

Hasil penelitian menunjukkan DNCB dapat menimbulkan displasia ringan, sedangkan Ter menimbulkan displasia ringan, sedang dan berat. Displasia berat terjadi akibat paparan Ter baik dengan DNCB (9,4%) maupun tanpa DNCB (2,8%) sebelumnya. Risiko terjadinya displasia akibat paparan DNCB adalah 1,33 kali lebih besar dibanding tanpa paparan DNCB. Risiko ini juga terjadi 3,55 kali lebih besar akibat paparan Ter daripada tanpa Ter, dan 0,77 kali lebih besar pada paparan DNCB-Ter dibanding tanpa paparan campuran keduanya. Korelasi antara skor perubahan epidermis dan sebaran limfosit menunjukkan arah positif dan kelompok yang diberi DNCB saja mempunyai koefisien korelasi paling tinggi. Prosentase jumlah limfosit dalam dermis yang mengekspresikan perforin pada keadaan displasia ringan menunjukkan DNCB-Ter (60,8%), Ter saja (75%), dan DNCB saja (66,7%). Pada displasia berat / mikro-invasi, prosentase limfosit untuk kelompok DNCB-Ter (82,8%) lebih tinggi dari kelompok yang terpapar Ter saja (51,4%).

Kesimpulannya adalah paparan DNCB dapat menimbulkan perubahan neoplastik yang lebih ringan dari Ter, meningkatkan sebaran limfosit intradermal, dan meningkatkan prosentase limfosit yang mengekspresikan Perforin (CTL dan sel NK) pada keadaan displasia berat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Stricker RB, Zhu YS, Elswood BF, et al. Pilot study of topical dinitrochlorobenzene (DNCB) in human immunodeficiency virus infection. *Immunol Lett*, 1993 ; 36 (1) : 1-6.
2. Traub A, Margulis SB, Stricker RB. Topical immune modulation with dinitrochlorobenzene in HIV disease : a controlled trial from Brazil. *Dermatology*, 1997 ; 195 (4) : 369-73.
3. Constantinides P. *General Pathobiology*. Connecticut : Appleton and Lange, 1994.
4. Stites DP. *Clinical Laboratory Methods for detection of Cellular Immunity*. In : *Basic And Clinical Immunology*. 8<sup>th</sup> ed. New Jersey : Lange Medical Book, 1994.
5. Goldberg B. How DNCB works. [Http://www.sci.med.aids](http://www.sci.med.aids) FAQ : DNCB. 1995.
6. Arts JH, Droge SC, Bloksma N, Kuper CF. Local lymph node activation in rats after dermal application of the sensitizers 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride. *Food Chem Toxicol*, 1996 ; Jan 34 (1) : 55-62
7. Dearman RJ, Moussavi A, Kemeny DM, Kimber I. Contribution of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subsets to the cytokine secretion patterns induced in mice during sensitization to contact and respiratory chemical allergens. *Immunology*, 1996 ; 89(4) : 502-10
8. Holliday MR, Corsini E, Smith S, et al. Different induction of cutaneous TNF-alpha and IL-6 by topically applied chemicals. *Am J Contact Dermat*. 1997 ; Sep 8 (3) : 158-64.
9. Orita K, Miwa H, Ogawa K, et al. Reduction of immunological Surveillance level in cancer patients. In : *Cancer Immunology*. Japan : University of Tokyo Press, 1974.
10. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders, Co, 1994
11. Trosko JE, Ruch RJ. Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in Bio science*, 3, 208-236, 1998.  
[Http://bioinformatics.weizmann.ac.il:3456/bioscience/1998/v3/d/trosko/2.htm](http://bioinformatics.weizmann.ac.il:3456/bioscience/1998/v3/d/trosko/2.htm)
12. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Neoplasia*. In : *Basis Pathology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders Co, 1997
13. Archer MC. *Chemical carcinogenesis*. In : *The basic science of oncology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York : Mc Graw-Hill Inc, 1992
14. Ika PM, Sarjadi. Pengaruh DNCB (dinitroklorobensen pada pertumbuhan kanker kulit (studi pendahuluan). *Maj Kedokter Diponegoro*. Semarang 1993 ; 28 : 173-9.

15. Sarjadi. Karsinoma epidermoid serviks uteri (Beberapa aspek epidemiologi serta peran histopatologi dan petanda tumor dalam penentuan prognosis). Disertasi Doktor. Universitas Diponegoro. Semarang, 1985.
16. Sarjadi. Registrasi kanker dalam konteks penanggulangan penyakit kanker. Pidato pengukuhan guru besar UNDIP. Balai Penerbit Universitas Diponegoro Semarang, 1992
17. Sarjadi, Ika Pawitra Miranti, Age Standardized Rate Kanker kulit dan Melanokarsinoma penduduk Kodya Semarang tahun 1987-1989 sesuai Topografi dan jenis histologiknya. Maj Kedokter Diponegoro. 1990 ; no.4 Suppl : 275-84.
18. Borst J, Cope A. Turning on the immune system on. *Immunology Today*. 1999 ; 20 ( 4): 156-8
19. Dutton RW, Swain SL, Bradley LM. The generation and maintenance of memory T and B cells. *Immunology Today*. 1999 ; 20 (7) :291-3
20. Lavker RM, Grove GL, Ligman AM. The atrophogenic effect of crude coal tar in human epidermis. *Br. J Dermatol* 1981 ; 105 : 77-9.
21. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-prosesing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology Today*. 2000 ; 21(9) : 455-64
22. Moretta L, Biassoni R, Bottino C, et al. Human NK-cell receptors. *Immunology Today*. 2000 ; 21(9) : 420-2
23. Kawasaki A, Shinkai Y, Kuwana Y, et al. Perforin, a pore-forming detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *Int Immunol*. 1990 ; 2 (7) : 677-84.
24. Goldberg B. DNCB treatment instructions. [Http://www.sci.med.aids](http://www.sci.med.aids) FAQ : DNCB. 1993.
25. Greenberg. Mechanism of tumor immunology. In: *Basic and Clinical Immunology*. 8<sup>th</sup> ed. New Jersey : Lange Medical Book, 1994.
26. Hameed A, Olsen KJ, Cheng L, et al . Immunohistochemical Identification of Cytotoxic Lymphocytes using Human Perforin Monoclonal Antibody, *Am J Pathol*, 1992 ; May 140 (5 ) : 1025-30.
27. Leong ASY. Immunohistochemistry-theoretical and practical aspects. In : *Applied immunohistochemistry for the surgical pathologist*. London : Edward Arnold, 1993.
28. Husaini Usman, Setiady Akbar RP. *Pengantar Statistik*. Cetakan I. Jakarta : Bumi Aksara, 1995.

29. Pratiknyo AW. Dasar-dasar metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. Cetakan I. Jakarta : CV Rajawali, 1986.
30. Purnawan Jumadi. Pengantar analisis data. Cetakan I. Jakarta : PT.Rineka Cipta, 1995.
31. Tjarta HA. Prosedur baku Pemeriksaan patologi Anatomik. Cetakan I. Jakarta : CV Rajawali, 1986.
32. Timbrell JA. Factors affecting toxic responses : metabolism. In :Principles of Biochemical Toxicology. London : Taylor & Francis Ltd, 1982.