



**HUBUNGAN ANTARA HITUNG AgNOR  
DENGAN GRADING HISTOLOGI PADA  
KARSINOMA DUKTUS INFILTRATIF PAYUDARA**

**Rr. PADMI TRI HARTINI**

**TESIS**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I  
PROGRAM STUDI PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
SEMARANG  
2002**



**HUBUNGAN ANTARA HITUNG AgNOR  
DENGAN GRADING HISTOLOGI PADA  
KARSINOMA DUKTUS INFILTRATIF PAYUDARA**

**Diajukan pada Bagian Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro  
Sebagai syarat untuk menyelesaikan  
Pendidikan dokter spesialis  
Dalam bidang Patologi Anatomi**

**Oleh :  
Rr. PADMI TRI HARTINI**

**BAGIAN PATOLOGI ANATOMI  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO  
RSUP Dr. KARIADI SEMARANG  
2002**

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : HUBUNGAN ANTARA HITUNG AgNOR DENGAN  
GRADING HISTOLOGI PADA KARSINOMA DUKTUS  
INFILTRATIF PAYUDARA

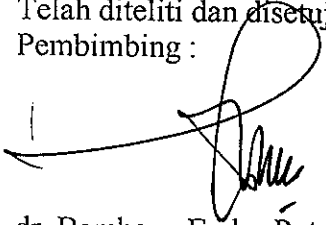
Ruang Lingkup : PATOLOGI ANATOMI

Nama Peneliti : Rr. Padmi Tri Hartini

Pembimbing : dr. Bambang Endro Putranto, SpPA

Semarang, April 2002

Telah diteliti dan disetujui oleh  
Pembimbing :



dr. Bambang Endro Putranto, SpPA  
NIP. 130.765.159

Peneliti :



Rr. Padmi Tri Hartini  
NIP. 140.336.162

Penelitian ini dilakukan  
Di Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Kariadi Semarang  
Sebagai syarat untuk menyelesaikan pendidikan  
Dokter Spesialis Patologi Anatomi

Hasil Penelitian ini merupakan milik :  
Bagian / SMF Patologi Anatomi  
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro  
Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Kariadi  
Semarang

Telah diajukan dan disetujui  
Semarang, April 2002

Ketua Bagian/ SMF  
Patologi Anatomi  
FK UNDIP/RSUP Dr. Kariadi



dr. Kasno, SpPA  
NIP 130 529 455

Ketua Program Studi PPDSI  
Patologi Anatomi  
FK UNDIP



dr. Noor Yazid, SpPA  
NIP 130 352 547

*Persembahkan buat suamiku Ir. Setyo Purwono, MT beserta Novita dan Yves  
Terima Kasih atas doa dan dukungannya,  
Serta persembahkan khusus bagi mereka yang berjuang melawan karsinoma payudara  
Semoga Allah swt. senantiasa melimpahkan rahmatNya*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah swt atas segala rahmat dan petunjuk-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Tesis ini disusun untuk memenuhi persyaratan penyelesaian studi pada Program Pendidikan Dokter Spesialis I bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Karya yang sederhana ini tak akan terwujud tanpa adanya keterlibatan berbagai pihak. Banyak hambatan dan kesulitan yang saya hadapi selama pelaksanaan penelitian tesis ini, namun berkat dorongan dan bantuan dari berbagai pihak dapat diselesaikan. Pada kesempatan ini perkenankanlah saya menyampaikan ungkapan rasa terima kasih yang dalam kepada :

1. Prof. Dr. dr Sarjadi SpPA, Prof. Dr. dr. Tjahjono SpPA, dan dr. Bambang Endro Putranto SpPA yang telah banyak memberikan dorongan dan bimbingan dalam penyusunan Tesis ini.
2. dr. Kasno SpPA dan dr. Noor Yazid SpPA Ketua Bagian/SMF dan KPS PPDS I Patologi Anatomi FK. Undip.
3. Prof dr. Subowo SpPA dan Para Staf/Senior di Bagian Patologi Anatomi atas pengetahuan dan bimbingan selama saya mengikuti pendidikan.
4. Suami, anak, orangtua, mertua dan keluarga yang selalu memberi dorongan moral dan doa.
5. Para teknisi dan rekan residen yang telah banyak memberi bantuan
6. Semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat disebutkan di sini.

Seperti ungkapan “tak ada gading yang tak retak” maka saya sangat menyadari adanya banyak kekurangan dalam pelaksanaan penelitian ini. Oleh karenanya segala bentuk saran akan saya terima dengan hati lapang. Harapan saya semoga karya ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu, khususnya dalam upaya penanganan kanker payudara.

Semarang, April 2002

Rr.Padmi Tri Hartini

## ABSTRACT

**Background.** Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR) have been correlated with proliferative activity of neoplasms. Increased AgNOR may reflect increase proliferative activity of cells. To explore this hypothesis, 38 breast carcinoma, infiltrating duct carcinoma type were processed for AgNOR silver staining. AgNOR count were expressed as mean AgNOR/nucleus per 100 cells and percentage of tumor cells with five AgNOR/nucleus or more. The first count was designated mean AgNOR or mAgNOR, and the second count was designated AgNOR proliferative index or p\_AgNOR. We correlated the AgNOR count with tumor histological grading.

**Methods.** Tumor samples obtained from 38 patients who underwent surgery between 1999 and 2001 in Kariadi Hospital Semarang. The cases were classified according to World Health Organization. All tumors were infiltrating duct carcinoma. Tumor grade was reevaluated by two observers, and established using the modified semiquantitative criteria of Bloom and Richardson. Two representative sections with the same grade were recut for the AgNOR silver staining using the two above-mentioned counts.

**Result.** There were 4 patients grade 1 (G1), 23 patients G2, and 11 patients G3. Using Spearman's rank statistical analysis, both counts of AgNOR show a statistically significant correlation with histological grading. The mean AgNOR has a correlation degree 0,838 ( $P = 0.00$ ); and pAgNOR counts have correlation degree 0,826 ( $P = 0.00$ ).

**Conclusion.** AgNOR count showed a statistically significant correlation with histological grade in invasive ductal carcinoma.

**Key words:** AgNOR, infiltrating duct carcinoma of the breast, proliferative activity, grading.

## ABSTRAK

**Latar belakang** AgNOR berhubungan dengan aktivitas proliferasi tumor. Bertambahnya jumlah AgNOR menunjukkan peningkatan aktivitas proliferasi. Untuk menggali hipotesa ini, kami melakukan pulasan AgNOR pada 38 sampel karsinoma duktus infiltratif payudara. Dilakukan 2 cara penghitungan AgNOR, yaitu hitung rerata AgNOR atau  $m_{AgNOR}$  pada tiap inti per 100 sel, dan  $p_{AgNOR}$  yaitu jumlah inti sel yang memiliki anak inti lima atau lebih per 100 sel. Dilakukan penghitungan korelasi antara hitung AgNOR dengan grading histologis.

**Metode.** Diperoleh sebanyak 38 sampel pasien yang menjalani mastektomi di Rumah Sakit dokter Kariadi Semarang dari tahun 1999 hingga tahun 2001. Dilakukan penggolongan tumor menurut kriteria WHO. Semuanya dari jenis karsinoma duktus infiltratif. Penilaian ulang grading tumor dilakukan oleh 2 orang peneliti, menggunakan metode semikuantitatif dari Bloom dan Richardson yang telah diperbaharui. Diambil 2 bagian potongan pada tiap sampel dengan grade sama untuk dipulas dengan pulasan AgNOR, dan dilakukan penghitungan dengan kedua cara tersebut di atas.

**Hasil.** Didapatkan grade 1 (G1) sebanyak 4 sampel penderita, G2 23 sampel penderita, dan G3 11 sampel penderita. Pada uji statistik menggunakan ranking Spearman, didapatkan derajat korelasi antara grading dengan rerata AgNOR sebesar 0,838 ( $P = 0.00$ ) dan dengan  $p_{AgNOR}$  sebesar 0,826 ( $P = 0.00$ )

**Kesimpulan.** Terdapat hubungan yang bermakna antara hitung AgNOR dengan grading pada Karsinoma duktus infiltratif payudara.

Key words : AgNOR, infiltrating duct carcinoma of the breast, proliferative activity, grading.



## DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar	v
Abstrak	vi
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	x
Daftar Gambar	xi
Bab I Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
Bab II Tinjauan Pustaka	5
2.1 Karsinoma Payudara	5
2.2 AgNOR	10
2.3 Kerangka Teori dan Konsep	14
Bab III Hipotesis	15
Bab IV Metode Penelitian	16
4.1 Rancangan Penelitian	16
4.2 Bahan	16
4.3 Penentuan Grading	16
4.4 Cara Pewarnaan AgNOR	18
4.5 Cara Hitung AgNOR	18
4.6 Pengolahan Data	19
Bab V Hasil Penelitian	22
5.1 Hubungan antara Grading dengan m_AgNOR	22
5.2 Hubungan antara Grading dengan p_AgNOR	24

Bab VI Pembahasan	26
Bab VII Kesimpulan dan Saran	29
7.1 Kesimpulan	29
7.2 Saran	29
Daftar Pustaka	
Lampiran	
L.1 Gambar Slide Pewarnaan AgNOR pada Karsinoma Duktus Infiltratif untuk berbagai Grading	

## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Hasil Perhitungan Korelasi Spearman antara Variabel Nilai Hitung m_AgNOR dengan Grading Karsinoma Duktus Infiltratif	23
Tabel 5.2	Hasil Perhitungan Korelasi Spearman antara Variabel Nilai Hitung p_AgNOR dengan Grading Karsinoma Duktus Infiltratif	25

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1	Diagram Pencar Hitung $m_{AgNOR}$ terhadap Grading Karsinoma Duktus Infiltratif	22
Gambar 5.2	Diagram Pencar Hitung $p_{AgNOR}$ terhadap Grading Karsinoma Duktus Infiltratif	24
Gambar L.1	Pulasan AgNOR pada karsinoma duktus infiltratif grade I, objektif 100X dengan minyak emersi. Diambil dari kasus dengan nomor PA 011790, dengan $m_{AgNOR}$ 1.64 dan $p_{AgNOR}$ 3.5	L-1
Gambar L.2	Pulasan AgNOR pada karsinoma duktus infiltratif grade II, objektif 100X dengan minyak emersi. Nomor PA 011822, dengan $m_{AgNOR}$ 2.37 dan $p_{AgNOR}$ 8.5	L-1
Gambar L.3	Pulasan AgNOR pada karsinoma duktus infiltratif grade III, objektif 100X dengan minyak emersi. Nomor PA 01735, dengan $m_{AgNOR}$ 3.44 dan $p_{AgNOR}$ 17.5	L-2

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 LATAR BELAKANG MASALAH

Karsinoma payudara merupakan salah satu kasus kanker terbanyak pada wanita<sup>1</sup>. Di Amerika Serikat kasus ini dinyatakan sebagai penyebab kematian nomor dua setelah kanker paru. Pada tahun 2000 didapatkan sebanyak 185.000 kasus kanker payudara invasif dan 42.000 diantaranya meninggal dunia<sup>2</sup>.

Di Indonesia, data dari 13 pusat pelayanan Patologi Anatomi menunjukkan urutan yang sama setelah kanker leher rahim<sup>3</sup>. Di Semarang karsinoma payudara menempati urutan kedua setelah kanker leher rahim, dengan jumlah kasus sebanyak 769 kasus atau 18.84 kasus per tahun per 100.000 penduduk (Age Standardized Incidence Rate) atau sebanyak 12.16 kasus pertahun. Angka ini menunjukkan penurunan dibanding jangka 5 tahun sebelumnya<sup>4</sup>. Diduga, penggunaan mammografi maupun pemeriksaan payudara oleh diri sendiri sangat berperan pada penurunan insidensi ini<sup>5,6,7</sup>. Berbagai faktor predisposisi yang berperan dalam pertumbuhan kanker payudara diantaranya adalah faktor keturunan<sup>8</sup>, paparan hormon estrogen<sup>9</sup> dan diet<sup>10</sup>. Dua pertiga bagian dari karsinoma payudara adalah karsinoma duktus infiltratif.

Beberapa parameter prognostik yang dapat digunakan untuk memperkirakan kelangsungan hidup penderita karsinoma payudara adalah ukuran tumor primer, penyebaran lokal, tipe histologi, grading histologi<sup>11</sup>, status reseptor steroid, dan keterlibatan limfonodi aksiler<sup>12,13,14</sup>.

Hingga saat ini, stadium tumor merupakan sarana untuk memperkirakan kelangsungan hidup penderita karsinoma payudara yang paling banyak digunakan. Status limfonodi aksiler masih tetap menjadi penentu prognosis paling penting<sup>10,15,16</sup>, tetapi sekarang dibutuhkan informasi tambahan karena (1) sebagian besar penderita karsinoma payudara memiliki nodus negatif saat dianalisis ditegakkan dan (2) 25% hingga 30% penderita dengan status limfonodi negatif akan kambuh dalam 10 tahun.

Stadium, terutama status limfonodi adalah bentuk pengukuran kemungkinan metastasis. Penggunaan sistem TNM pada pengukuran stadium menentukan keputusan terapi yang akan dilaksanakan. Akhir-akhir ini, proliferasi sel sebagai suatu cara pengukuran prognosis, menjadi pusat perhatian pada banyak penelitian<sup>17</sup>. Beberapa peneliti sepakat bahwa mengukur tingkat proliferasi sel merupakan hal yang sangat penting, walaupun kesepakatan mengenai bagaimana cara mengukur proliferasi sel masih sangat kurang, termasuk kemudahan cara pengukuran, kesahihan, dan relevansi klinik. Metode penilaian proliferasi sel tertua dilakukan dengan cara menghitung mitosis. Tapi terdapat beberapa kritik tentang kekurangannya yaitu tidak sah, tak sepenuhnya menggambarkan jumlah total sel yang membelah, dan sangat membosankan. Akhir akhir ini digunakan bermacam-macam teknik pengukuran proliferasi sel dengan uptake nukleotida, analisa sitometri alur, dan analisa protein yang berhubungan dengan aktivitas proliferasi sel seperti Ki67, dan PCNA<sup>18,19,20</sup>.

Nucleolar Organizer Regions ( NOR ) adalah rangkaian DNA pada lengan pendek kromosom akrosentrik yang mengkode ribosomal RNA. Karena sifat nukleoproteinnya yang argirofil , NOR yang terpulas perak didefinisikan sebagai AgNOR dan protein NOR argirofil sebagai protein AgNOR , yang dapat terlihat pada sediaan sitologi atau histologi rutin sebagai bintik hitam atau coklat gelap pada inti interfase. Banyaknya AgNOR dipertimbangkan menjadi suatu indeks aktivitas transkripsional dan juga pengukuran kemampuan mitosis seluler<sup>21,22,23</sup>. Didapatkan nilai hitung AgNOR yang berbeda pada jaringan normal, jaringan yang mengalami proliferasi reaktif, proliferasi jinak, maupun keganasan. Beberapa peneliti membuktikan bahwa nilai hitung AgNOR memiliki hubungan dengan derajat agresivitas dan kelangsungan hidup pada berbagai macam kanker<sup>24,25,26,27,28,29</sup>, sehingga hitung AgNOR digunakan secara meluas pada patologi tumor sebagai suatu sarana untuk menilai kecepatan proliferasi<sup>30,31</sup>. Hitung AgNOR terdiri dari dua cara yaitu, hitung rerata AgNOR atau mAgNOR per 100 sel<sup>27,29,32,33</sup> dan prosentase AgNOR atau pAgNOR yaitu jumlah sel yang mengandung butir AgNOR lima atau lebih dalam tiap inti sel per 100 sel<sup>34,35,36,37</sup>.

Diferensiasi sel adalah tingkat kemiripan sel tumor dibanding sel normal, baik secara morfologi maupun fungsional. Penggambaran diferensiasi sel kanker secara numerik dinyatakan sebagai grading histologi atau derajat diferensiasi<sup>38</sup>. Pada tahun 1957 Bloom dan Richardson menetapkan suatu sistem grading pada karsinoma infiltratif payudara, berdasarkan pada gambaran tubuler, indeks mitosis, dan pleomorfisme inti, yang kemudian oleh WHO dianjurkan penggunaannya<sup>39,40</sup>. Pada tahun 1984 Elston memodifikasi sistem grading yang diajukan Bloom & Richardson dengan memberi penilaian yang lebih detail, menjadi suatu metode semikuantitatif<sup>13</sup>.

Pada beberapa penelitian, nampak bahwa hasil pewarnaan AgNOR memiliki hubungan dengan pemeriksaan sitometri alur dan pewarnaan imunohistokimia petanda proliferasi seperti Ki 67<sup>35,36</sup>. Jumlah AgNOR sudah terbukti sebagai faktor prognostik pada kasus karsinoma testis<sup>41</sup>, serviks uteri<sup>42</sup>, meningioma<sup>32,33</sup>, karsinoma paru<sup>26,27,28</sup>, dan tumor padat yang lain<sup>24</sup>. Beberapa peneliti mendapatkan suatu hubungan antara nilai hitung AgNOR dengan grading histologi pada karsinoma serviks uteri<sup>34,42</sup> dan meningioma<sup>32,33</sup>, sementara peneliti yang lain mendapatkan hasil yang sebaliknya<sup>28</sup>.

Dibandingkan pemeriksaan aktivitas proliferasi dengan uptake nukleotida, dan sitometri alur, hitung AgNOR lebih mudah dilakukan, sementara dibandingkan dengan pemeriksaan aktivitas proliferasi yang lain seperti Ki67 dan PCNA, hitung AgNOR lebih mudah, cepat dan menggunakan metode yang lebih obyektif<sup>31</sup>.

## 1.2 RUMUSAN MASALAH

Apakah ada hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histologi pada karsinoma duktus infiltratif payudara ?

### 1.3 TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum dilakukannya penelitian ini adalah :

Membuktikan terdapatnya hubungan antara hitung Ag NOR dengan grading histologi pada karsinoma duktus infiltratif payudara

Tujuan khusus :

- Membuktikan terdapatnya hubungan antara m AgNOR dengan grading histologi karsinoma duktus infiltratif payudara.
- Membuktikan terdapatnya hubungan antara p AgNOR dengan grading histologi karsinoma duktus infiltratif payudara.

### 1.4 MANFAAT PENELITIAN

Pewarnaan AgNOR bermanfaat untuk :

- Membantu menegakkan diagnosis pada kasus meragukan , yang belum dapat ditentukan keganasannya.
- Meramalkan prognosis yang bisa digunakan pada penelitian selanjutnya.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Karsinoma Payudara**

##### **2.1.1 Definisi**

Karsinoma payudara adalah suatu proliferasi ganas dari sel epitel yang melapisi duktus atau lobulus pada jaringan payudara<sup>2</sup>.

##### **2.1.2 Epidemiologi**

Di Amerika setiap tahun ditemukan sekitar 100.000 kasus baru karsinoma payudara, dan 30.000 diantaranya meninggal dunia. Insidensi karsinoma payudara tinggi di negara – negara Amerika dan Eropa, tetapi rendah di Asia dan Afrika<sup>43</sup>. Di Indonesia , data dari 13 sentra patologi menunjukkan bahwa karsinoma payudara menempati tempat kedua teratas setelah kanker leher rahim<sup>3</sup> , urutan yang sama dijumpai di Semarang<sup>4</sup> . Sangat jarang ditemukan pada usia di bawah 25 tahun kecuali kasus – kasus dengan riwayat keluarga, dengan puncak insidensi pada saat atau setelah menopause<sup>10</sup>

##### **2.1.3 Lokasi**

Sekitar 50 % lokasi karsinoma payudara pada kuadran lateral atas, 15 % pada kuadran medial atas, 10 % pada kuadran lateral bawah, 5% pada kuadran medial bawah, 17 % pada regio sentral (1cm areola), dan 3% difus atau multifokal. Dijumpai pula lokasi multisentris yaitu suatu keadaan dimana kuadran yang lain mengandung karsinoma payudara , selain kuadran dominan yang terkena. Lokasi bilateral lebih banyak dijumpai pada karsinoma payudara invasif, dan wanita yang dalam keluarganya terdapat penderita karsinoma payudara<sup>43</sup>

#### 2.1.4 Diagnosis

Diagnosis karsinoma payudara ditegakkan dengan :

Pemeriksaan histopatologi dari sediaan biopsi, FS, maupun hasil mastektomi

Pemeriksaan Sitologi

- Dua metode untuk mendapatkan material sitologi didapat dari aspirasi sekresi puting susu dan aspirasi dari lesi dengan jarum halus. Aspirasi sekresi puting susu hanya sedikit sekali kepentingannya. Beberapa karsinoma memang seringkali didapatkan dari material ini, tetapi positif palsu sangat tinggi. Keadaan ini berbeda dengan aspirasi menggunakan jarum halus, yang memiliki tingkat kepercayaan sangat tinggi, dengan sensitivitas 87% dan spesifitas mendekati 100%

#### 2.1.5 Klasifikasi

Klasifikasi karsinoma payudara menurut WHO adalah sebagai berikut<sup>10</sup> :

##### A. Non invasif

- 1a. Karsinoma Intraduktus
- 1b. Karsinoma Intraduktus dengan penyakit Paget
2. Karsinoma Lobular in situ

##### B. Invasif (infiltrating)

- 1a. Karsinoma duktus invasif
- 1b. Karsinoma Duktus invasif dengan penyakit Paget
2. Karsinoma Lobular invasif
3. Karsinoma Meduler
4. Karsinoma Koloid atau Musinosum
5. Karsinoma Tubuler
6. Karsinoma Adenoid Kistik
7. Karsinoma Apokrin
8. Karsinoma Papiler invasif

### 2.1.6 Karsinoma Duktus Invasif

Merupakan jenis terbanyak pada karsinoma payudara dengan kejadian, sekitar 65% hingga 80% dari seluruh karsinoma payudara<sup>1,7</sup>. Gambaran khas jenis ini adalah bertambahnya jaringan ikat fibrus, yang memberi konsistensi keras (karsinoma skirus). Pertumbuhan nampak sebagai nodul keras seperti batu yang berbatas tegas dengan ukuran diameter 1 hingga 2 cm dan jarang lebih dari 4 hingga 5 cm. Pada perabaan terasa perlekatan dengan struktur di sekitarnya dan melekat dengan dinding dada. Kulit payudara di atas tumor nampak menjadi cekung dan puting susu menjadi tertarik. Potongan di bawah puting yang tertarik akan memiliki konsistensi keras mirip tulang rawan, dan menimbulkan bunyi gemeretak saat diiris.

Secara histologi tumor tersusun atas sel sel ganas yang melapisi duktus dalam bentuk tali, sarang –sarang sel yang padat, tubulus, kelenjar, massa yang saling beranastomosis, atau gabungan dari semuanya yang nampak jelas menyebuk dalam jaringan ikat di sekitarnya. Gambaran selnya beragam dari ukuran kecil dengan inti teratur, moderat hiperkromasi hingga sel yang sangat besar dengan inti sangat tidak teratur dan sangat hiperkromasi. Seringkali nampak invasi perivaskuler maupun perineural<sup>10</sup>.

### 2.1.7 Indikator Prognostik

Bermacam pola telah dievaluasi sebagai indikator prognostik untuk karsinoma payudara. Beberapa diantaranya yang dianggap lebih dari yang lain dan yang memiliki potensi dapat mempengaruhi penanganan karsinoma payudara adalah :

- (1) Ukuran kurang dari 1 cm dinyatakan memiliki prognosis baik dan lebih dari 5 cm memiliki prognosis yang buruk.
- (2) Penyebaran lokal akan memiliki prognosis lebih buruk dibanding yang tidak.

- (3) Grading karsinoma payudara rendah akan memiliki prognosis lebih baik dibandingkan dengan grading yang lebih tinggi.
- (4) Reseptor status yang positif, baik Estrogen Reseptor, Progesteron Reseptor atau keduanya akan memiliki prognosis yang lebih baik dibandingkan dengan Status Reseptor yang negatif.
- (5) Limfonodi aksiler yang mengandung tumor akan memiliki prognosis yang lebih buruk dibanding dengan limfonodi aksiler yang tidak mengandung tumor<sup>13</sup>.

Selain hal tersebut di atas, beberapa peneliti menyertakan angiogenesis<sup>44,45</sup>, fraksi pertumbuhan tumor<sup>12,14</sup>, proliferasi sel<sup>12,17</sup>, dan usia<sup>46</sup> sebagai indikator prognostik.

#### 2.1.7.1 Grading Histologis

Serangkaian perubahan terjadi setelah sel terjejas. Perubahan yang terjadi bergantung pada besarnya jejas dan kemampuan 'host' untuk bertahan. Sebagian besar agen kimia dan fisik penginduksi kanker sangat reaktif, yang bila agen tersebut bereaksi dengan DNA pada sel yang terjejas, akan merusak banyak tempat yang menjadi pengontrol transformasi neoplastik. Agen yang sama dapat menghasilkan tumor pada organ sama dengan gambaran yang berbeda tergantung pada gen mana yang berubah atau hilang. Pada keadaan tertentu bila hanya tempat transformasi yang berubah, tumor yang terjadi masih tetap dapat mempertahankan gambaran struktur dan fungsi yang dihasilkan oleh jaringan asal tumor. Sebagai contoh tumor yang muncul dari kulit masih tetap menyerupai sel - sel kulit dan secara fungsional tetap menghasilkan produk kulit. Bila gen yang bertanggungjawab terhadap struktur normal mengalami lebih banyak kerusakan, maka sel tumor yang nampak akan memiliki sedikit morfologi dan fungsi sel-sel normal jaringan asalnya. Pada keadaan yang lebih parah, sel dapat kehilangan hampir seluruh morfologi dan fungsi yang dimiliki jaringan normal asalnya. Hilangnya ciri-ciri normal ini disebut sebagai dediferensiasi atau anaplasia. Para ahli patologi dapat membuat penggolongan dengan perkiraan derajat dediferensiasi pada pemeriksaan mikroskop. Secara umum,

didapatkan suatu hubungan antara grading tumor dengan tingkat pertumbuhan. Tumor dengan grading rendah, berdiferensiasi baik cenderung untuk tumbuh lebih lambat, dan tumor anaplastik akan lebih cepat tumbuh. Walaupun hubungan tersebut tidak mutlak kebenarannya, tapi dapat memberi petunjuk yang berguna untuk menilai perilaku tumor. Hal ini terjadi karena tingkat pertumbuhan tumor juga dipengaruhi terutama oleh reaksi pertahanan pasien<sup>47</sup>.

Koss menyatakan bahwa diferensiasi sel adalah kemampuan sel untuk mencapai tingkat pematangan morfologi maupun biologi yang ditandai dengan produk akhir yang secara fungsional berguna. Manifestasi dari diferensiasi, yang terlihat pada mikroskop, terletak pada sitoplasma dan bukan pada inti.

Sementara Constantinedes menyatakan bahwa dediferensiasi atau anaplasia merupakan perubahan seluler pada kanker yang terjadi pada sitoplasma dan inti sel. Perubahan pada inti dicirikan sebagai :

- (1) Meningkatnya rasio inti sitoplasma yang disebabkan oleh kecepatan dan kontinuitas pembelahan sel yang mengalami transformasi ganas, yang tidak diikuti oleh kemampuan sitoplasma mencapai volumenya.
- (2) Bertambahnya kandungan DNA inti. Ini terjadi karena DNA dapat menggandakan sendiri secara berulang-ulang tanpa memiliki respon dengan kantung inti. Inti yang anaplastik cenderung untuk menjadi poliploidi, yang secara mikroskopik dapat terlihat sebagai penambahan kromatin atau hiperkromasi inti, maupun sel dengan inti berukuran besar.
- (3) Bertambah hebat produksi rRNA untuk membentuk protein sitoplasma anak sel. Karenanya nukleolus, sebagai tempat produksi rRNA cenderung untuk membesar dan bermigrasi mendekati membran inti.
- (4) Kecepatan pembelahan DNA yang masih berespon dengan sliung inti tapi tidak diikuti oleh pembelahan sitoplasma menyebabkan timbulnya gambaran multinukleasi.
- (5) Abnormalitas jumlah kromosom yang nampak sebagai partikel heterokromatin yang seringkali sulit teridentifikasi karena bertambahnya granularitas inti.

- (6) Perubahan inti terpenting yang dapat menyebabkan serangkaian perubahan yang terjadi di atas adalah semakin tingginya frekuensi mitosis<sup>48</sup>

Pada karsinoma payudara, grading merupakan penggambaran diferensiasi sel kanker secara numerik yang biasanya terbagi dalam tiga atau empat grade. Grade I adalah tumor berdiferensiasi baik, sedang grade III atau IV adalah tumor berdiferensiasi buruk. Grade II merupakan nilai antara keduanya. Beberapa peneliti mendapatkan bukti bahwa grading tumor ganas mempengaruhi perjalanan penyakit dan prognosis. Semakin baik diferensiasi tumor, semakin lambat tingkat progresi dan kemampuannya untuk bermetastasis. Grading merupakan bentuk pengamatan yang subyektif, yang hasilnya bisa beragam tergantung pada pengetahuan, pengalaman, dan persepsi dari ahli patologi. Pada saat ini, digunakan sistem grading semikuantitatif yang memadukan unsur penghitungan obyektif dalam setiap komponennya untuk meningkatkan kesahihan grading<sup>13,38</sup>. Metode semikuantitatif berdasarkan pada tiga gambaran morfologi karsinoma payudara invasif tanpa memperhitungkan jenis karsinoma payudara<sup>40,49</sup>. Cara grading ini pertama kali diusulkan oleh Bloom dan Richardson yang kemudian oleh WHO dianjurkan penggunaannya<sup>39</sup>.

## 2.2 Argyrophilic Nucleolar Organizer Region

Nukleolus atau anak inti merupakan suatu unit struktural- fungsional dari inti sel interfase yang berbatas tegas dimana gen-gen ribosom berada dan sintesa RNA ribosom terjadi. Nukleoli biasanya dapat terlihat dengan mikroskop cahaya dengan morfologi yang sangat bervariasi bergantung pada aktivitas sel. Pada sel dengan sedikit produksi RNA, nukleoli nampak sangat sedikit atau tidak ada, seperti yang terlihat pada sel epitel gepeng dewasa. Sejak akhir abad yang lalu, ahli patologi menyadari bahwa hipertropi nukleolus merupakan satu dari gambaran sel kanker. Nukleoli tersusun atas 3 komponen utama yaitu : (1) Senter fibriler, (2) Komponen fibriler padat, yang terletak di tepi senter fibriler, (3) Komponen granuler yang

mengelilingi komponen fibriler. Nukleoli yang sangat kecil terdiri atas senter fibriler tunggal besar yang dikelilingi oleh struktur ribonukleoprotein, sedangkan nukleoli besar tersusun atas senter fibriler kecil, banyak, masing-masing dikelilingi lingkaran komponen fibriler padat, yang sering berbaur dengan granula. Perbedaan morfologi dapat dinilai secara obyektif dengan mengukur jumlah dan ukuran senter fibriler, dimana ukuran dan jumlah senter fibriler berhubungan dengan jumlah dan distribusi ribonukleoprotein, dan dengan bentuk dan volume nukleolus. Sel normal manusia biasanya memiliki satu hingga tiga nukleoli kecil, dimana sel yang mengandung nukleoli 4, 5 lebih banyak dijumpai pada tumor ganas berdiferensiasi jelek. Long dan Taylor mengamati 36% dari sel ganas mengandung nukleoli lima atau lebih pada kanker ovarium berdiferensiasi jelek (grade III), yang tidak ditemukan pada kistoma ovarii serosum. Long juga mendapatkan sebanyak 25,6% sel ganas epitelial endometrium grade III (berdiferensiasi jelek) memiliki nukleoli lima atau lebih, dimana pada jaringan kontrol normal hanya mengandung dua hingga tiga nukleoli dalam tiap selnya. Sel jinak dengan lima nukleoli sangat jarang dijumpai (0.2% dari 15.400 inti sel endometrium normal pada beragam fase dalam siklus menstruasi). Pembesaran disertai perubahan bentuk nukleoli juga nampak secara bermakna pada sel kanker. Studzinski pada penelitiannya menyatakan bahwa bentuk dan ukuran nukleoli tergantung pada: Tingkat produksi RNA dalam nukleoli dan kebutuhan sitoplasma akan RNA. Bila kebutuhan sitoplasma akan RNA tetap tinggi dan produksi RNA terhambat, maka nukleoli akan mengecil dan 'kosong' ('ring form' nukleoli). Sebaliknya bila nukleoli sangat besar maka ini menggambarkan produksi RNA yang berlebih dibanding kebutuhan sitoplasmanya<sup>38</sup>. Oleh karenanya, perubahan morfologi nukleolar digunakan untuk mengenali sel ganas dari sel jinak<sup>32</sup>. Kepentingan morfologi nukleolar untuk tujuan diagnostik pada patologi tumor telah berkurang. Hal ini disebabkan pertama, bahwa variasi bentuk dan ukuran, pembesaran, maupun ketidakberaturan nukleoli yang sering dijumpai pada sel kanker, juga ditemukan pada sel-sel normal yang berproliferasi. Kedua bahwa pemeriksaan sediaan histologi dan sitopatologi rutin menggunakan mikroskop cahaya belum dapat menjelaskan perubahan morfologi nukleolus selama aktivasi pada sel kanker<sup>50</sup>.

Nukleoli kecil seringkali tidak terdeteksi dan nukleoli besar, tergantung pada bentuk dan ukurannya sering hanya didefinisikan sebagai 'prominen'.

Beberapa tahun yang lalu, pengertian perubahan nukleolar pada patologi tumor diperoleh dari pengamatan perubahan distribusi suatu kelompok protein nukleolar, yaitu protein AgNOR, pada sel ganas. Nucleolar Organizer Regions atau NOR adalah protein komponen ribosomal DNA yang ditranskripsikan pada ribosomal RNA. NOR dihubungkan dengan konstiksi sekunder kromosom metafase yang berlokasi dalam kromosom akrosentrik, contohnya kromosom 13,14,15,21, dan 22. NOR dapat dengan cepat dan jelas terlihat dengan pewarnaan perak asam nitrat, walaupun pulasan ini tidak dapat mewarnai seluruh NOR. Kemampuan perak untuk memulas NOR berkaitan dengan adanya satu rangkaian protein asam, yang sangat Argirofil. NOR yang terpulas perak didefinisikan sebagai AgNOR dan protein NOR argirofil sebagai protein AgNOR<sup>29</sup>.

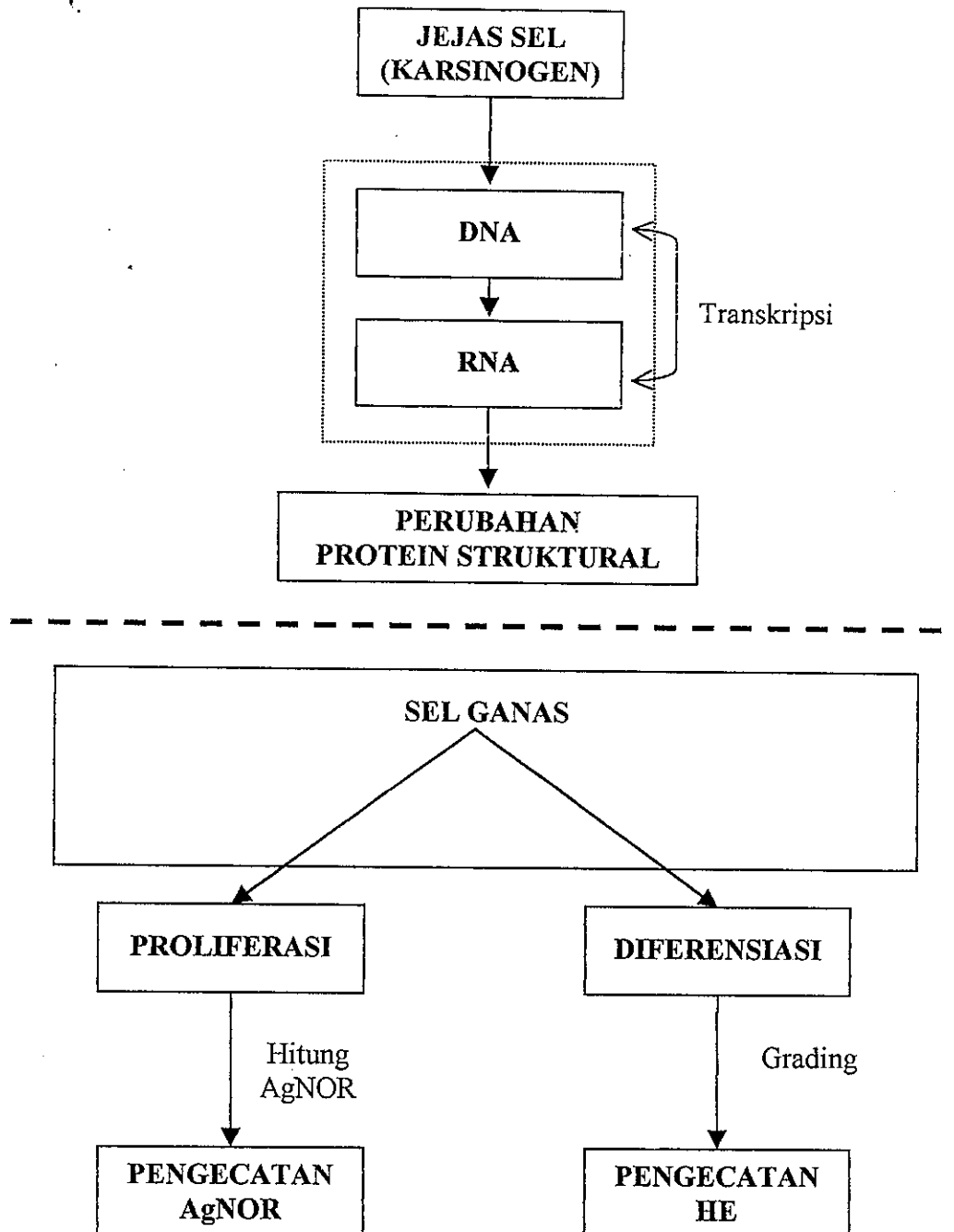
Pada 1986 Ploton menerapkan metode pulasan perak nitrat asam format untuk protein AgNOR menggunakan mikroskop cahaya, dan berhasil membuat visualisasi NOR (senter fibriler dan komponen fibriler padat) yang sangat tepat pada sampel sitologi rutin. Protein ini dibutuhkan bagi biogenesis ribosom dan secara selektif terwarnai dengan metode perak. Dengan memakai prosedur ini, AgNOR nampak sebagai bintik hitam dengan batas tegas dimana area yang ditempati oleh bintik yang tercat perak dalam nukleoli berhubungan dengan total area nukleoli. Perubahan dan distribusi NOR pada sel kanker dapat diakibatkan bertambahnya permintaan untuk biogenesis ribosom. Bila suatu sel terstimuli untuk berproliferasi, maka terjadi peningkatan jumlah AgNOR dan sintesa rRNA. Jumlah protein AgNOR bertambah dengan cepat saat sel istirahat memasuki siklus pembelahan sel dari G1 sampai akhir dari fase S. Pada sel yang terus berproliferasi, perubahan aktifitas transkripsional rRNA sangat berhubungan dengan distribusi kuantitatif struktur nukleolar di dalam sel. Begitupun area nukleolar keseluruhan per sel merupakan parameter morfologi dari kecepatan proliferasi sel<sup>50,51</sup>. Data ini dapat menunjukkan adanya hubungan antara fungsi (dan, sejauh ini, pola morfologi) dari nukleolus dan tingkat proliferasi pada sel kanker<sup>50,52</sup>.



Sejauh ini penggunaan prosedur pewarnaan perak yang digambarkan oleh Ploton membuat bentuk dan ukuran nukleoli sangat mudah dikenali dalam sampel rutin sitohistopatologi dengan menghitung distribusi dan jumlah bintik yang terwarnai perak.

Jumlah protein AgNOR terbukti memainkan peran sebagai suatu indikator prognostik yang sangat kuat pada penyakit neoplastik. Crocker dan Nar menduga bahwa jumlah AgNOR pada nukleus interfase menggambarkan keadaan aktif atau derajat keganasan pada jaringan tertentu<sup>24</sup>. Beberapa peneliti telah melaporkan kegunaan AgNOR untuk membantu menegakkan diagnosis<sup>24,31,53</sup>.

### 2.3 Kerangka Teori dan Konsep



### **BAB III**

### **HIPOTESA**

**Terdapat hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histologi karsinoma duktus infiltratif payudara**

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan penelitian**

Penelitian ini merupakan studi retrospektif dengan pendekatan belah lintang

#### **4.2 Bahan**

Sampel diambil secara acak, dari laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Umum Pusat Dokter Kariadi Semarang pada periode tahun 1999 - 2001. Setelah dilakukan penghitungan, diambil sebanyak 38 sampel penderita karsinoma payudara jenis duktus infiltratif yang memenuhi kriteria. Diambil tujuh sediaan tiap sampel untuk dilakukan penetapan grading histologi menggunakan pulasan rutin Hematoksilin Eosin dan. Dua bagian representatif dengan grading sama dipotong ulang untuk pewarnaan perak AgNOR.

#### **4.3 Penentuan grading**

Dilakukan penilaian ulang grading histologi oleh dua orang peneliti (BEP & PD) tanpa mengetahui nilai hitung AgNOR. Penilaian grading diambil dari kriteria Bloom Richardson yang telah dimodifikasi oleh Elston<sup>13,39,40</sup> (B-R), yang diakomodir oleh WHO berdasarkan pada tiga gambaran morfologi, yaitu :

1. Formasi tubulus
  - Gambaran tubulus maupun asiner yang jelas, dengan sel yang berkelompok secara teratur mengelilingi suatu ruangan atau celah, biasanya paling baik dilihat pada daerah dekat sentral tumor.

- Nilai 1 bila sediaan menunjukkan formasi tubulus yang jelas ( $>75\%$ ),
- Nilai 2 bila formasi tubulus sedang ( $> 10$  , dan  $< 75\%$ ),
- Nilai 3 bila formasi tubulus sedikit atau bahkan tidak berdiferensiasi ( $<10\%$ )

## 2. Jumlah mitosis

- Pada pembesaran rendah (  $\times 100$  ) tentukan daerah dengan mitosis terbanyak, kemudian hitung mitosis dengan pembesaran kuat (  $\times 400$  ) , biasanya banyak dijumpai pada bagian tepi tumor.
- Nilai 1 bila mitosis  $< 10$  pada 10 lapangan pandang ,
- Nilai 2 bila mitosis  $\geq 10$  dan  $< 20$  ,
- Nilai 3 bila mitosis  $\geq 20$

## 3. Pleiomorfisme inti

- Nilai 1 bila inti nampak seragam dalam bentuk dan ukuran relatif kecil , dengan pola kromatin tersebar , tanpa nukleoli yang menyolok.
- Nilai 2 bila inti agak pleiomorfik , ukuran sedang ,memiliki nukleoli.
- Nilai 3 bila inti relatif besar , bentuk dan ukuran beragam ,nukleoli menyolok atau bahkan multipel , dengan pola kromatin kasar

Grading merupakan hasil penjumlahan nilai formasi tubuler, banyaknya mitosis, dengan pleiomorfisme inti .

- Nilai total B-R 3, 4, atau 5 dinyatakan sebagai grading rendah (Grade I).
- Nilai total B-R 6 atau 7 dinyatakan sebagai grading sedang (Grade II).
- Nilai total B-R 8 atau 9 dinyatakan sebagai grading tinggi (Grade III).

Apabila dalam satu preparat ditemukan bagian dengan grading rendah dan bagian dengan grading lebih tinggi, maka sesuai kesepakatan profesi, diambil bagian terbanyak untuk penentuan grading . Apabila pada sediaan tersebut didapatkan bagian

yang sama banyak, maka diambil nilai grading yang lebih tinggi. Beberapa kriteria yang dipakai untuk mengeluarkan sampel adalah :

1. Sediaan dari sampel yang telah dipulas HE tak dapat dibaca.
2. Blok sediaan dari sampel cacat
3. Kesalahan awal diagnosa , meliputi jenis keganasan, dan penentuan grading, dan jumlah sediaan.

Pada sampel yang tidak memenuhi kriteria, maka dilakukan pengambilan ulang sampel secara acak.

#### **4.4 Cara Pewarnaan AgNOR**

Blok parafin yang telah dipilih dipotong setebal 3 mikron, dan dipulas dengan teknik pewarnaan perak AgNOR menggunakan metode Ploton<sup>54,55</sup>. Sediaan yang telah dipotong, dilakukan deparafinisasi dalam xylol dan alkohol dengan konsentrasi diturunkan setiap 5 menit. Kemudian dicuci selama 3 menit sebanyak 4 kali dalam akua bidest.. Jaringan kemudian diinkubasi dalam campuran 2 bagian 50 % larutan perak nitrat dalam air dengan 1 bagian 2% gelatin dalam asam format 1 %. Inkubasi dilakukan dalam ruang gelap pada suhu ruangan selama 45 menit. Kemudian dicuci sebanyak 3 kali dengan cara celup , dan dikeringkan dengan alkohol bertingkat dengan konsntrasi yang semakin tinggi , mulai 80 %, 95 %, absolut . Selanjutnya dilakukan 'clearing' dengan xylol., Mounting dilakukan dengan Kanada balsam<sup>54</sup>.

#### **4.5 Cara Hitung AgNOR**

Hitung AgNOR dilakukan tanpa mengetahui grading dari tumor tersebut. Hitung AgNOR dilakukan sesuai metode Ploton dengan menghitung jumlah AgNOR interfase per sel dengan pembesaran kuat ( x 1000 lensa dengan minyak emersi) pada 100 sel tumor<sup>31</sup> , menggunakan mikroskop cahaya. Pada setiap sediaan (satu sampel terdiri dari dua sediaan) dilakukan 2 x penghitungan pada daerah yang paling anaplastik, hindari bagian nekrotik, dan hindari sel yang bertumpuk, dengan hasil

penghitungan dibagi dua. AgNOR tunggal dan AgNOR kecil yang ada pada kelompok dihitung dengan hati-hati . Bila didapatkan struktur yang tumpang tindih, dan tidak didapatkan struktur tunggal, maka dihitung sebagai suatu AgNOR tunggal . Kontrol internal reaksi dilakukan dengan penghitungan AgNOR pada limfosit yang hanya memiliki satu bintik AgNOR . Dilakukan penghitungan rata- rata jumlah AgNOR pada setiap inti per 100 sel yang dinyatakan sebagai m AgNOR dan penghitungan jumlah sel yang memiliki kandungan AgNOR lima atau lebih pada setiap inti per 100 sel yang dinyatakan sebagai prosentase AgNOR atau pAgNOR pada setiap sediaan <sup>25</sup> . Nilai rerata AgNOR pada masing- masing sampel (terdiri dari 2 sediaan) dijumlahkan , kemudian dibagi dua. Prosentase AgNOR pada masing – masing sampel (terdiri dari dua sediaan) dijumlahkan, kemudiaan dibagi dua.

#### 4.6 Pengolahan data

Setelah dilakukan penghitungan dan mendapatkan rerata maupun prosentase, dilakukan uji korelasi Spearman untuk mengetahui adanya hubungan antara hitung AgNOR dengan grading histologi

Cara perhitungan sampel <sup>56</sup> :

$$n = \frac{Nz^2 p(1-p)}{Nd^2 + z^2 p(1-p)}$$

- n : besar sampel
- N : besar populasi (jumlah populasi acuan)
- z : nilai standard normal yang besarnya tergantung  $\alpha$
- p : probabilitas suatu kejadian
- d : besarnya penyimpangan yang masih bisa ditolerir

Pada penelitian ini diketahui bahwa besarnya Populasi acuan N sebesar 769<sup>3</sup> dan probabilitas kejadian karsinoma duktus infiltratif sebesar 0.883<sup>2</sup>. Berdasarkan rumus diatas untuk nilai penyimpangan d sebesar 0.1 % dan derajat kepercayaan sebesar 95% maka akan didapat ukuran sampel untuk penelitian sebesar  $n = 38$ .

Pada penelitian ini akan dicari arah hubungan dan derajat hubungan antar variabel yang diamati, yaitu variabel Grading, dan variabel Hitung AgNOR. Ukuran derajat hubungan antar variabel itu dapat dinyatakan dalam suatu nilai tertentu yang dinamakan Koefisien Korelasi antar variabel. Penilaian Grading menggunakan data ordinal sehingga Metode Korelasi yang digunakan pada penelitian ini adalah Metode Korelasi Rank Spearman.

### **Metode Korelasi Rank Spearman**

Statistik Ranging Spearman sering disebut juga dengan “rho ( $\rho$ )”. Statistik ini menuntut kedua variabel pengamatan diukur dalam skala ordinal, sehingga objek obyek atau individu individu yang diamati dapat dirangking dalam dua rangkaian berurut.

Metode analisa Koefisien Korelasi Rank Spearman yang dilakukan pada penelitian ini secara garis besarnya dapat digambarkan sebagai berikut :

1. Variabel pertama (grading) dan variabel kedua (nilai hitung AgNOR dalam bentuk mAgNOR dan pAgNOR) masing masing disusun secara berurut dan dirangking secara terpisah
2. Apabila terdapat data yang sama, maka rangking diambil dari nilai rata ratanya
3. Dilakukan perhitungan nilai selisih rangking (d) untuk setiap pasangan variabel pertama dan kedua
4. Dilakukan perhitungan nilai kuadrat dari setiap selisih pasangan rangking



5. Dilakukan perhitungan nilai statistik koefisien korelasi Spearman  $\rho_s$  dengan persamaan :

$$\rho_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{N(N^2 - 1)}$$

6. Apabila terdapat data pengamatan yang sama, maka statistik  $\rho_s$  dihitung dengan rumus :

$$\rho_s = \frac{\sum x^2 + \sum y^2 - \sum d_i^2}{2\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}}$$

dimana :

$$\sum x^2 = \frac{N^3 - N}{12} - \sum T_x \qquad \sum T_x = \sum \frac{t_x^3 - t_x}{12}$$

$$\sum y^2 = \frac{N^3 - N}{12} - \sum T_y \qquad \sum T_y = \sum \frac{t_y^3 - t_y}{12}$$

$t_x$  = jumlah data pada data yang sama untuk variabel pertama

$t_y$  = jumlah data pada data yang sama untuk variabel kedua

#### 7. Kriteria Pengujian :

- $H_0$  diterima jika nilai  $\rho_s$  hasil hitung lebih kecil daripada  $\rho_s$  tabel.
- $\rho_{\text{tabel}} = \rho_{\alpha/2(n-2)}$  dimana  $\alpha$  = taraf nyata (Significant degree)

Perhitungan nilai korelasi Rank Spearman  $\rho_s$  dilakukan secara manual dan secara program menggunakan software SPSS 10. Perhitungan koefisien Korelasi Rank Spearman tersebut dilakukan untuk pasangan variabel penelitian dengan susunan sebagai berikut :

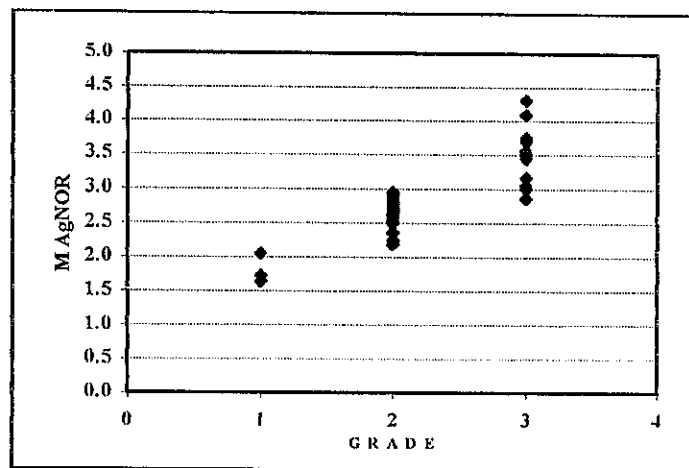
- Variabel Hitung m\_AgNOR dengan Grading
- Variabel Hitung p\_AgNOR dengan Grading

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

Data penelitian diambil dari sampel penderita berdasarkan populasi kanker payudara di Semarang. Jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian ini sebanyak 38 sampel, yang terdiri dari 4 sampel Grade 1; 23 sampel Grade 2, dan 11 sampel Grade 3.

#### 5.1 Hubungan antara m\_AgNOR dengan Grading



Gambar 5.1. Diagram Pencar Hitung m\_AgNOR terhadap Grading Karsinoma Duktus Infiltratif Payudara.

Koefisien Korelasi Spearman tanpa memperhitungkan faktor koreksi

$$\rho_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{N(N^2 - 1)} = 1 - \frac{6 \times 1,364}{38 \times (38^2 - 1)} = 0.851$$

Koefisien Korelasi Spearman dengan memperhitungkan faktor koreksi

$$\rho_s = \frac{\sum x^2 + \sum y^2 - \sum d_i^2}{2 \sqrt{\sum x^2 \sum y^2}} = \frac{3,442.5 + 4,569 - 1,364}{2 \times \sqrt{3,442.5 \times 4,569}} = 0.838$$

Perhitungan uji signifikansi t-student

$$t = \frac{\rho_s \sqrt{N-2}}{\sqrt{1-\rho_s^2}} = \frac{0.838 \times \sqrt{38-2}}{\sqrt{1-0.838^2}} = 9.22$$

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Korelasi Spearman antara Variabel Nilai Hitung m\_AgNOR dengan Grading Karsinoma Duktus Infiltratif

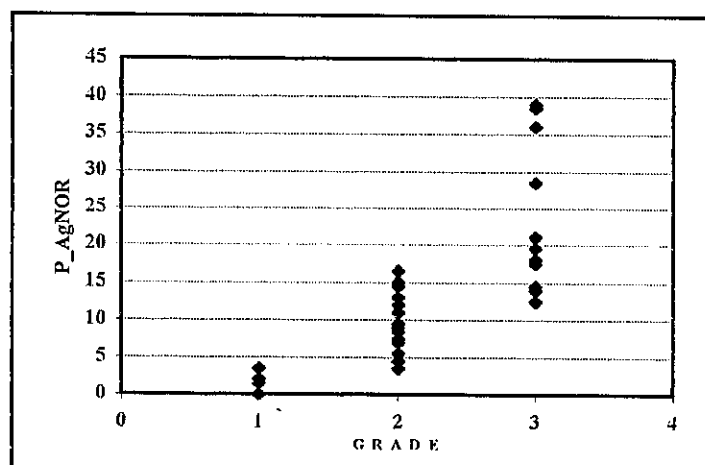
SPEARMAN CORRELATIONS		GRADING	MAGNOR	
Spearman's rho	GRADING	Correlation Coefficient	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.000	
		N	38	
	MAGNOR	Correlation Coefficient	.838	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	
		N	38	38

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

Dari penghitungan didapatkan nilai  $\rho_s$  sebesar 0,838 dengan arah hubungan positif. Hubungan ini memiliki derajat asosiasi tinggi, dan apabila dilihat dengan tabel, maka  $H_0$  ditolak ( $H_1$  diterima) yaitu terdapat hubungan antara grading dengan AgNOR. Semakin tinggi grading, semakin banyak hitung rerata AgNOR.

Diperoleh m AgNOR grade I sebesar 1,77 ( $\pm 0,21$  SD); grade II sebesar 2,68 ( $\pm 0,22$  SD) dan grade III sebesar 3,49 ( $\pm 0,46$  SD)

## 5.2 Hubungan antara p\_AgNOR dengan Grading



Gambar 5.2. Diagram Pencar Hitung p\_AgNOR terhadap Grading Karsinoma Duktus Infiltratif Payudara.

Koefisien Korelasi Spearman tanpa memperhitungkan faktor koreksi

$$\rho_s = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{N(N^2 - 1)} = 1 - \frac{6 \times 1,456}{38 \times (38^2 - 1)} = 0.841$$

Koefisien Korelasi Spearman dengan memperhitungkan faktor koreksi

$$\rho_s = \frac{\sum x^2 + \sum y^2 - \sum d_i^2}{2 \sqrt{\sum x^2 \sum y^2}} = \frac{3,442.5 + 4,562 - 1,456}{2 \times \sqrt{3,442.5 \times 4,562}} = 0.826$$

Perhitungan uji signifikansi t-student

$$t = \frac{\rho_s \sqrt{N-2}}{\sqrt{1-\rho_s^2}} = \frac{0.826 \times \sqrt{38-2}}{\sqrt{1-0.826^2}} = 8.80$$

Tabel 5.3 Hasil Perhitungan Korelasi Spearman antara Variabel Nilai Hitung p\_AgNOR dengan Grading Karsinoma Duktus Infiltratif

SPEARMAN CORRELATIONS			GRADING	PAGNOR
Spearman's rho	GRADING	Correlation Coefficient	1.000	<b>.826</b>
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	38	38
	PAGNOR	Correlation Coefficient	<b>.826</b>	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	38	38

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

Dari penghitungan didapat nilai  $\rho_s$  sebesar 0.826 dengan arah hubungan positif. Hubungan ini memiliki derajat asosiasi tinggi, dan apabila dilihat dengan tabel, maka  $H_0$  ditolak ( $H_1$  diterima) yaitu terdapat hubungan antara grading dengan pAgNOR. Semakin tinggi nilai Grading dari Karsinoma Duktus Infiltratif Payudara akan semakin tinggi pula nilai Hitung p\_AgNOR.

Didapatkan p AgNOR pada grade I 1,75 ( $\pm 1,4$  SD) grade II 9,35 ( $\pm 3,4$  SD) dan grade III 23 ( $\pm 10,1$  SD)

UPT-PUSTAK-UNDIP

## **BAB VI PEMBAHASAN**

Dalton menyatakan grading histologi modifikasi Bloom & Richardson digunakan pada karsinoma infiltratif tanpa memandang tipe tertentu <sup>49</sup>. Sependapat dengan hal ini Tavasoli menyatakan bahwa grading histologi menurut skema B&R paling tepat digunakan pada karsinoma duktus infiltratif <sup>13</sup>. Beberapa peneliti menyatakan bahwa grading kurang sahih karena berdasarkan pengamatan subyektif. Meskipun demikian, peneliti lain menyatakan subyektivitas yang terjadi tidak akan terlalu berbeda, misal grade II dinyatakan sebagai grade III atau grade I dengan grade II. Disamping itu, kecil kemungkinan terjadi perbedaan yang besar antar pengamat, misal seorang pengamat menyatakan grade I dan pengamat lain menyatakan grade III. Untuk memperkecil perbedaan yang terjadi, beberapa peneliti menambahkan cara semikuantitatif yang ternyata meningkatkan nilai obyektifitas, sehingga grading dapat digunakan sebagai indikator prognostik. Berdasarkan hal tersebut di atas maka pada penelitian ini dilakukan penilaian grading oleh dua orang penilai sehingga didapat hasil yang obyektif.

Serangkaian perubahan terjadi setelah sel terjejas, dengan tingkat perubahan yang berbeda. Sebagian besar agen penginduksi terjadinya kanker sangat reaktif, yang akan merusak DNA sel yang menjadi pengontrol transformasi neoplastik. Agen yang sama dapat menghasilkan tumor pada organ dengan gambaran yang berbeda tergantung pada kerusakan gen. Bila gen yang bertanggungjawab terhadap struktur normal mengalami kerusakan, sel tumor yang nampak akan berupa gangguan morfologi dan fungsi sel-sel normal jaringan asalnya. Pada keadaan yang lebih parah, sel dapat kehilangan hampir seluruh morfologi dan fungsi yang dimiliki jaringan normal asalnya. Hilangnya ciri-ciri normal ini disebut sebagai dediferensiasi atau anaplasia yang terjadi baik di dalam inti maupun sitoplasma. Grading pada karsinoma payudara infiltratif, merupakan penggolongan derajat dediferensiasi pada pemeriksaan mikroskop. Sebagai suatu patokan, akan didapatkan suatu gambaran hubungan antara grading tumor dengan tingkat pertumbuhan. Tumor dengan grading rendah, berdiferensiasi baik

cenderung tumbuh lebih lambat , dan tumor anaplastik akan lebih cepat tumbuh. Walaupun hubungan tersebut tidak mutlak kebenarannya, tapi dapat memberi petunjuk yang berguna untuk menilai perilaku tumor. Disamping itu tingkat pertumbuhan tumor juga dipengaruhi terutama oleh reaksi pertahanan pasien <sup>47</sup>

Dari tabel 5.1 mengenai penghitungan m AgNOR dengan grading terlihat bahwa terdapat hubungan yang sangat erat antara hitung rerata AgNOR dengan grading. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi grade maka hitung rerata bintik AgNOR pada tiap 100 sel akan bertambah. Semakin tinggi grade berarti semakin jelek diferensiasi , dimana dediferensiasi yang dinilai pada grading karsinoma payudara meliputi dediferensiasi inti dan sitoplasma. Pada dediferensiasi tinggi berarti akan semakin sedikit dijumpai struktur tubuler atau asiner dan semakin banyak dijumpai sel dengan rasio inti sitoplasma yang meningkat akibat kecepatan pembelahan sel yang mengalami transformasi ganas, disertai perubahan bentuk dan ukuran nukleoli yang cenderung bertambah besar akibat bertambah hebatnya produksi RNA <sup>48</sup>. Perubahan bentuk dan ukuran nukleoli inilah yang pada pulasan AgNOR akan menjadi jelas terlihat. Pada sisi lain, ukuran nukleoli memiliki hubungan yang sangat erat dengan kecepatan sel berproliferasi <sup>50</sup>. Jumlah rerata AgNOR menunjukkan aktivitas proliferasi sel atau pola agresivitas yang meningkat. Hal ini bisa dilihat dari penelitian <sup>23,25,28,29,34,36,52</sup> yang mendapatkan perbedaan jumlah bintik AgNOR pada sel normal, jinak dan ganas. Pada sel ganas dengan grading tinggi, diferensiasi jelek , yang terkait dengan bertambahnya tingkat proliferasi sel ganas dengan tingkat kemiripan yang semakin kurang, maka butir AgNOR akan bertambah. Walid MA dalam penelitiannya menggunakan pewarnaan AgNOR bersamaan dengan pemeriksaan sitometri alur , menyatakan bahwa jumlah rerata AgNOR lebih menunjukkan ploidi atau tingkat agresivitas tumor daripada aktivitas proliferasi. Berpedoman pada grade rendah (I) dan grade tinggi (II dan III) didapat bahwa apabila jumlah rerata AgNOR lebih dari 2,4 maka sel tumor memiliki tingkat agresivitas yang tinggi. Sementara aktifitas proliferasi lebih ditunjukkan oleh pAgNOR, atau prosentase AgNOR yaitu jumlah sel yang mengandung bintik AgNOR lima atau lebih dalam 100 sel ganas yang diperiksa. Apabila dalam 100 sel ganas yang diperiksa dijumpai prosentase sebanyak 8 atau lebih sel yang mengandung bintik

AgNOR lebih besar atau sama dengan lima, maka dinyatakan tumor tersebut memiliki aktivitas proliferasi yang tinggi<sup>35,36,37</sup>.

Pada tabel 5.2 mengenai penghitungan p AgNOR dengan grading terlihat bahwa terdapat hubungan yang sangat erat antara hitung prosentase AgNOR dengan grading. Pada gambar 5.2 nampak bahwa hubungan tersebut memiliki arah yang positif. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi grade maka semakin banyak sel ganas yang memiliki butir AgNOR lima atau lebih. Pengamatan yang sangat tepat mengenai morfologi nukleolus dan perubahannya selama aktivasi sel atau transformasi tidak mungkin dilakukan pada preparat histologi dan sitopatologi rutin pada tingkat mikroskop cahaya. Nukleoli kecil seringkali tidak terdeteksi. Pada 1986, Ploton dan rekan menerapkan metode pulasan perak nitrat asam format untuk protein AgNOR pada tingkat mikroskop cahaya, dan berhasil membuat visualisasi NOR (senter fibriler dan komponen fibriler padat). Sehingga dengan memakai cara ini bentuk dan ukuran nukleoli lebih mudah dikenali dan dihitung. Pada karsinoma duktus infiltratif payudara dengan grade tinggi, maka akan banyak dijumpai sel ganas yang mengalami perubahan bentuk dan ukuran nukleoli. Nukleoli cenderung bertambah besar akibat bertambah hebatnya produksi RNA<sup>48</sup>. Derenzini menyatakan bahwa area yang ditempati butir AgNOR berhubungan dengan area total nukleoli. Dimana perubahan bentuk dan distribusi NOR pada sel kanker dapat diakibatkan oleh bertambahnya permintaan untuk biogenesis ribosom. Penelitian Walid MA menyatakan bahwa terjadi peningkatan p AgNOR seiring dengan peningkatan grade. Pada penelitian tersebut Walid membagi modifikasi Bloom & Richardson menjadi 2 grade yaitu grade rendah dan grade tinggi. Walid menyatakan bahwa p AgNOR lebih mencerminkan aktivitas proliferasi daripada mean AgNOR. Pada penelitian ini tidak dapat diketahui apakah p AgNOR atau m AgNOR yang lebih menunjukkan aktivitas proliferasi, karena pada penelitian ini tidak disertakan pemeriksaan sitometri alur yang bisa secara lebih tepat menunjukkan kandungna DNA, yang memberi gambaran mengenai ploidi maupun aktivitas proliferasi. Hanya saja baik m AgNOR maupun p AgNOR menunjukkan peningkatan secara bermakna seiring dengan peningkatan grading histologi.



## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **7.1 Kesimpulan**

1. Terdapat hubungan antara nilai hitung m AgNOR dengan grading histologis karsinoma duktus infiltratif payudara dengan arah positif, yaitu semakin tinggi grading akan semakin tinggi hitung rerata  $\bar{x}$  AgNOR dalam tiap inti sel per 100 sel.
2. Terdapat hubungan antara nilai hitung p AgNOR dengan grading histologis karsinoma duktus infiltratif payudara dengan arah positif, yaitu semakin tinggi grading akan semakin banyak ditemukan sel yang mengandung bintik AgNOR lima atau lebih dalam tiap inti sel per 100 sel .

#### **7.2 Saran**

1. Hitung AgNOR dapat digunakan untuk membantu menegakkan diagnosa.
2. Hitung AgNOR dapat digunakan untuk meramalkan prognosis pada penelitian selanjutnya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Berg J W , Hutter RVP . Breast cancer . Cancer 1995 ; 75 : 257-69
2. Marc LE. Breast cancer. In : Harrison's principles of internal medicine . 15<sup>th</sup> ed . New York : McGraw Hill, Health Profession Division ; 2001
3. Sarjadi, Padmi Tri Hartini. Cancer registration in Indonesia. Asian Pacific J Cancer Prev 2001 ; 2, IACR Supplement, 21-4
4. Sarjadi, Padmi T, Pawitra M . Insiden kanker penduduk Semarang tahun 1990-1999. Medika Medika Indonesia , 2001 ; 36 : 15-21
5. Donegan L.V, Spratt S John . Cancer of the breast. W.B. Saunders Company. 3<sup>rd</sup> edit. Philadelphia .1988
6. Sondik EJ. Breast cancer trends : Incidence, mortality and survival. Cancer 1994 ; 74 : 991-4
7. Garfinkel L , Boring CC , Heath CW . Changing trends . An overview of breast cancer incidence and mortality . Cancer 1994 ; 74 : 222-7
8. Helzlsouer KJ, Couzi R . Hormones and breast cancer. Cancer 1995 ; 76 : 2059-63
9. Weber BL, Abel KJ, Brody LC, Flejter WL, Chandrasekharappa SC, Couch FJ et al. Familial breast cancer . Cancer 1994 ; 74 : 1013-20
10. Robin SL, Kumar V, Cotran RS. Robbin's pathologic basis of disease . W.B Saunders Co. Philadelphia . 5<sup>th</sup> edit 1995
11. Pereira H. , Pinder S.E ., Sibbering D.M., Galea M.H., Elston C.W., Blamey R.W. et al . Pathological prognostic factors in breast cancer . IV : Should you be a typer or a grader ? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. Histopathology (1995) 27 :219-26
12. Tjahyadi G. The new histologic sub-types and some prognostic parameters in breast cancer. Majalah Patologi Indonesia. 3-11
13. Tavassoli FA. Pathology of the breast. 3<sup>rd</sup> edit. Elsevier Science Publishing Co, New York, 1992

14. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* 1994 ; 74 : 381-400
15. Simpson JF, Page DL . Cellular proliferation and prognosis in breast cancer. Statistical purity versus clinical utility. *Hum Pathol* 1994 ; 25 : 331-2
16. Van de velde CJH , Bosman FT , Wagener DJTh. *Onkologi . Alih bahasa Arjono .Edisi ke 5 1999 . Panitia Kanker RSUP DR. Sardjito*
17. Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993; 71: 3926-31
18. Gasparini G, Boracchi P, Verderio P, Bevilacqua P. Cell kinetics in human breast cancer comparison between the prognostic value of of the cytofluorimetric S-phase frastion and that of the antibodies to Ki 67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. *Int J Cancer* 1994 ; 57 : 822-9
19. Isola JJ, Helin HJ, Helle MJ, Kallioniemi O. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis and mitotic count. *Cancer* 1990; 65 : 1180-4
20. Merkel DE, Mc Guire ML. Ploidy, proliferative activity and prognosis. DNA flowcytometri of solid tumor. *Cancer* 1990 ; 65 : 1194-1205
21. Gautier T, Robert-Nicoud M, Guilly MN, Hernandez-Verdun D. Relocation of nucleolar proteins around chromosomes at mitosis by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Sci* 1992 Aug ; 102: 729-37
22. Papadimitriou SI, Daskalopoulou D, Tsaftaris P, Markidou S, Stamatelou M. Evaluation of argyrophilic nucleolar organiser region (AgNORs) in multiple myeloma. *J Clin Pathol* 2000 ; 53 : 462-5
23. Layfield LJ, Katharine L, Dodge R, Barsky SH. Uterine smooth muscle tumors. Utility of classification by proliferation , ploidy, and prognostic markers versus traditional histopathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 ; 124 : 221-7
24. Egan MJ, Crocker J. Nucleolar Organiser Region in pathology. *Br J Cancer* 1992 ; 61:1-8
25. Pich A, Margaria E, Chiusa L. Proliferative activity is a significant prognostic factor in male breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994 ; 145 : 481-9

26. Chern JH, Lee YC, Yang MH, Chang SC, Perng RP. Usefulness of argyrophilic nucleolar organizer regions score to differentiate suspicious malignancy in pulmonary cytology. *Chest* 1997 ; 111 : 1591-6
27. Rodrigues OR, Antonangelo L, Yagi N, Minamoto H, Schmidt AF, Capellozi VL et al. Prognostic significance of nucleolar organizer region (AgNOR) in resected non small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1997 ; 27 (5) 298-304
28. Mourad WA, Vallieres E, Chuen J, Alrobaish A. Cell kinetics analysis of surgically resected non small cell carcinoma of the lung using the AgNOR silver stain. *Ann Saudi Med* 1997 ; 17 (2) : 161-66
29. Ofner D, Riedmann B, Maier H, Hittmair A, Rumer A, Totsch M et al . Standardized staining and analysis of argyrophilic nucleolar organizer region associated protein (AgNORs) in radically resected colorectal adenocarcinoma – correlation with tumour stage and long term survival .*Journal of Pathology* 1995 ; 175 : 441-8
30. Ross JS. DNA ploidy and cell cycle analysis in cancer diagnosis and prognosis. *Oncology* 1996 ; 10 (6) : 867-90
31. Derenzini M, Sirri V, Tere D. Nucleolar organizer regions in tumor cells. *The Cancer Journal* 1994 ; volume 7, number 2; 1-9
32. Kunishio K, Ohmoto T, Matsuhisa T, Maeshiro T, Furuta T, Matsumoto K. The significance of nucleolar Organizer Region (AgNOR) score in predicting meningioma recurrence . *Cancer* 1994 ;73 : 2200-5
33. Orita T, Kajiwara K, Nishizaki T, Ikeda N, Kamiryo T, Aoki H. Nucleolar organizer regions in meningioma. *Neurosurgery* 1990 ; 26 (1) : 43-6
34. Miller B, Flax S, Dockter M, Photopulos G. Nucleolar Organizer Region in Adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994 ; 74 : 3142-5
35. Mourad WA, Setrakian S, Hales ML, Abdulla M, Truco G. The Argyrophilic nucleolar organizer regions in ductal carcinoma in situ of the breast. The significance of ploidy and proliferation activity analysis using this silver staining technique. *Cancer* 1994 ; 74 : 1739-45

36. Mourad WA, Balis BE, Livingstone S, Shoukri M, Cox CE, Nicosia SV et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status . *Cancer* 1992 ; 69 : 1739-44
37. Mourad WA, Devlo S, Setrakian S. Predictors of invasion in ductal carcinoma in situ of the breast : the value of scoring system . *Ann Saudi Med* 1997 ; 17 (4) : 427-31
38. Koss, LG. Diagnostic cytology and histopathologic bases. 4 th edit. Philadelphia : J.B. Lippincott Company, 1992
39. Garne PJ, Aspergren K, Linell F, Rank F, Ranstam J. Primary prognostic factors in invasive breast cancer with special reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade . *Cancer* 1994; 73 : 1438-48
40. Scarff WR, Torloni H. Histological typing of breast tumours . International histological classification of tumours . World Health Organization . Geneva. 1968
41. Meng FJ, Giwerzman A, Skakkebaek NE. Investigation of carcinoma in situ cells of testis by quantification of argyrophilic nucleolar organizer region associated proteins (AgNORs). *J Pathol* 1996 ; 180: 206-13
42. Singhal R, Pandey LK. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in precancerous and cancerous lesion of cervix . *BHJ* [ serial online ] Available from : <http://www.bhj.org/journal/2000>. Accessed February 26,2001
43. Rosai J. Ackerman's surgical pathology . 8<sup>th</sup> edit . Washington DC : Mosby Company , 1996
44. Morphopoulos G, Pearson M, Ryder JDW, Howell A, Harris M. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Journal of Pathology*, 1996; vol 180 : 44-9
45. Miliaras D, Kamas A, Kalekou H. Angiogenesis in invasive breast carcinoma : is it associated with parameter of prognostic significance? *Histopathology* 1995; 26 : 165-9
46. Chung M, Chang RH, Bland IK, Wanebo JH. Younger women with breast carcinoma have a poorer prognosis than older women. *Cancer* 1996 ; 77 : 97-103
47. Franks LM , Teich NM. Introduction to the cellular and molecular of cancer. 3<sup>rd</sup> edit. New York : Oxford University Press, 1998

48. Constantinedes P. General pathobiology. Norwalk, Connecticut : Appleton & Lange, 1994.
49. Dalton LW, Page DL, Dupont WD. Histologic grading of breast carcinoma . A Reproducibility study . Cancer 1994 ; 73 : 2765-70
50. Derenzini M, Trere D, Passion A, Montanaro L, Sirri V, Ochs RL . Nucleolar function and Size in cancer cells. Am J Pathol 1998, 152 ; 1291-7
51. Zurita F, Jimenes R, Burgos M, Diaz de la Guardia R. Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between r DNA levels and expression of homologous nucleolar organizing regions : a hypothesis for NOR structure and function . Journal of Cell science 1998 ; 111 : 1433-9
52. Schwint AE, Savino TM, Lanfranchi HE, Marschoff MS, Cabrini RL, Itoiz ME. Nucleolar organizer region in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. Cancer 1994 ; 73 : 2674-9
53. Fonseca LM, Carmo MAV. AgNORs in hyperplasia, papilloma, and oral squamous cell carcinoma. Braz Dent J 2000; 11(2) 105-10
54. Aubele M, Biesterfeld S, Derenzini M, Hufnagl P, Martin H, Ploton D et al. Guidelines of AgNOR quantitation. Zentralbl Pathol 1994 ; 140 : 107-8
55. Ofner D , Aubele M, Bietersfield S, Derenzin M, Hufnagl P, Ploton D et al. Guidelines of AgNOR quantitation-first update. Virchow Arch 1995; 427:341.
56. Pudjihardjo WJ, Machfoed MH, Herjanto . Metode penelitian statistik terapan . Airlangga University Press. 1993