

616.04
MIR
p 4



DOSEN MUDA

LAPORAN PENELITIAN

**PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCB)
DALAM MENINGKATKAN RESPON LIMFOSIT LOKAL
UNTUK MENCEGAH KANKER KULIT AKIBAT PAPARAN
BAHAN KARSINOGEN TER PADA MENCIT C3H**

Oleh

Ika Pawitra Miranti, dr, M Kes
Udadi Sadhana, dr, M Kes
Awal Prasetyo, dr, M Kes

Biaya oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Tahun Anggaran 2002

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
OKTOBER 2002

UPT-PUSTAK UNDIP

RINGKASAN

PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCEB) DALAM
MENINGKATKAN RESPON LIMFOSIT LOKAL UNTUK MENCEGAH TIMBULNYA
KANKER KULIT AKIBAT PAPARAN KARSINOGEN TER PADA MENCIT C3H

Ika Pawitra Miranti, Udadi Sadhana, Awal Prasetyo
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Kontrak no : 018 / LIT / BPPK-SDM / IV / 2002 dengan Ditbinlitabmas-Ditjen Dikti

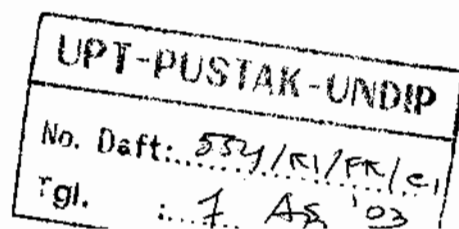
DNCEB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) merupakan imunostimulan yang kuat meskipun cara penggunaannya hanya dipaparkan pada kulit. Berbagai penelitian menunjukkan DNCEB menyebabkan terjadinya sebaran sel mononuklear dalam dermis, meningkatkan jumlah sel CTL dan sel NK, meningkatkan ekspresi TNF- α , dan produksi γ -IFN. Untuk penyakit kanker, DNCEB digunakan sebagai parameter defisiensi imun seluler. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat perbedaan respon limfosit lokal dan prosentase jumlah limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin. Perforin merupakan marker untuk sel CTL dan sel NK, yaitu sel yang membunuh sel kanker

Dengan metode penelitian *posttest-only randomized control group design*, tiga kelompok perlakuan masing-masing diberi campuran DNCEB-Ter ; Ter saja ; DNCEB saja, disertai kelompok kontrol sehat. DNCEB 10 μ g dalam aseton diteteskan untuk menimbulkan reaksi hipersensitivitas lambat, diteruskan olesan Ter pada kulit punggung seluas 1,5 x 1,5 cm selama 5 bulan. Pada akhir perlakuan kulit dipotong, dibelah menjadi 4 bagian yang sama, dan diproses menjadi jaringan yang tertanam dalam parafin sehingga terkumpul 128 blok parafin dari 32 mencit. Tiap blok dipotong dan diwarnai dengan Hematoksin-Eosin untuk melihat perubahan epidermis dan respon limfosit intradermal. Data yang terkumpul dinyatakan dalam skor . Beberapa blok yang menunjukkan displasia berat dipotong dan diwarnai dengan antibodi monoklonal anti-Perforin.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok yang terpapar DNCEB-Ter skor sebaran limfosit intradermal lebih tinggi dibanding tanpa DNCEB. Prosentase jumlah limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin pada displasia berat untuk kelompok DNCEB-Ter (82,8 %) lebih besar dibanding kelompok Ter (51,4 %).

Temuan diatas dapat disimpulkan bahwa DNCEB dapat meningkatkan respon limfosit lokal dan sel sitotoksik (sel CTL dan sel NK) pada keadaan displasia berat akibat paparan karsinogen Ter.

Kata kunci : DNCEB, Ter, respon limfosit lokal, Perforin



*SUMMARY*LOCAL LYMPHOCYTE RESPONDS AND SKIN CANCER PREVENTION USING
1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DN CB) ON TAR-INDUCED C3H MOUSE SKIN

Ika Pawitra Miranti, Udadi Sadhana, Awal Prasetyo

Department of Anatomical Pathology Medical Faculty Diponegoro University

DN CB (*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 DN CB can cause not only infiltration of mononuclear cells within the dermis, but also increase the number of CTL and NK cell, and the production of TNF- α and IFN- γ . In cancer, DN CB was only used as a parameter of cellular immune defeciencies. Based on our preliminary study, we are going to analyse that DN CB can increase local lymphocyte respons and the percentage of Perforin-expressed lymphocyte. Perforin is a marker of cytotoxic cell (CTL and NK cell) in cancer immunity process.

Using the posttest-only randomized control group design, each of three experimental groups was applied with DN CB and tar ; only DN CB ; and only tar. DN CB 10 micrograms in acetone was applied first to arise the delayed type hypersensitivity, followed by tar application on the 1,5x1,5 cm back area of the skin for 5 months. At the end of the experiment, the skin was cut and divided equally into 4 pieces and processed as a paraffin-embedded-tissue. In total there were 128 paraffin blocks ready to be stained with Hematoxyllin & Eosin. All datas were estimated in score. Several paraffin blocks showed severe dysplasia, were cut and stained with anti-mouse Perforin monoclonal antibody.

The study showed that the intradermal lymphocyte score of the group with DN CB and Tar was higher than the Tar-only group. In severe dysplasia / microinvasion, the percentage of Perforin-expressed lymphocyte of the DN CB and Tar group (82,8%) was higher than the Tar-only group (51,4%).

We conclude that DN CB can increase the local lymphocyte respons and the percentage of Perforin-expressed lymphocyte on Tar-induced severe dysplasia.

Keywords : DN CB, Tar, local lymphocyte respons, Perforin.

PRAKATA

Puji syukur yang tidak henti-hentinya saya panjatkan kepada Allah yang Maha Kuasa karena atas kehendaknya penelitian DNCB ini dapat diselesaikan. Pada kesempatan ini, saya ingin menghaturkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Rektor Universitas Diponegoro dan Bapak Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP yang telah memberi kesempatan dan bantuan demi kelancaran penelitian ini.
2. 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, beserta stafnya.
3. Prof.Dr.dr.Sarjadi, SpPA, Prof.Dr.dr.Tjahjono, SpPA, FIAC dan dr.Edi Dharmana,MSc, PhD, sebagai pen.bimbing onkologi dan imunologi.
4. Prof.dr.Nurdjaman dan dr.Sujoto, SpKK. sebagai narasumber dalam bidang prosesing jaringan dan histologi kulit.
5. dr.Wahyu Rochadi, MSc. sebagai narasumber statistik yang besar pengaruhnya untuk mengambil kesimpulan hasil penelitian yang dikerjakan disini.
6. dr.Kasno, SpPA. sebagai Ketua Bagian Patologi Anatomi FK UNDIP dan para teknisi Bag.PA FK UNDIP / RSUP dr.Kariadi yang telah mengizinkan dan membantu saya menggunakan sarana penelitian yang dibutuhkan dalam penelitian ini.
7. dr. Priyono Tirtoprodjo, SpPA, dr. Harijadi, SpPA, dr.Irianiwati, SpPA dari Bagian Patologi Anatomi FK UGM yang telah memberi kesempatan dan membantu dalam pewarnaan imunohistokimia.

Harapan kami penelitian ini dapat berlanjut, tentu saja dengan dukungan dari berbagai pihak yang berperan dalam bidang onkologi, imunologi, dan pihak lain yang peduli terhadap kanker pada umumnya.

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN <i>SUMMARY</i>	iii
PRAKATA	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB I : PENDAHULUAN	1
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB III : TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
BAB IV : METODE PENELITIAN	8
BAB V : HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	14
BAB VI : KESIMPULAN DAN SARAN	17
DAFTAR PUSTAKA	18
LAMPIRAN	20

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. : Kelompok mencit yang mengalami displasia berat	14
Tabel 2. : Skor limfosit intradermal yang mengalami displasia berat	14
Tabel 3. : Prosentase limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin pada displasia berat (pengamatan pada 10 lapang pandang dengan pembesaran mikroskop 400x).	16

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lamp.1 : Ilustrasi teknik pewarnaan imunohistokimia	20
Lamp 2 : Prosedur pewarnaan Antibodi Monoklonal anti-Perforin	21
Lamp 3 : Gambar hasil pewarnaan Antibodi Monoklonal anti-Perforin	22
Lamp 4 : Hasil pengamatan limfosit dengan pewarnaan MoAb anti-Perforin	23
Lamp 5 : Curriculum vitae personalia penelitian	24
Lamp 6 : Anggaran penelitian	27

BAB I PENDAHULUAN

1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) adalah bahan kimia yang digunakan sebagai imunomodulator / stimulan sistem imun seluler yang kuat, yang secara tak langsung dapat dipakai sebagai salah satu cara untuk menanggulangi penyakit karena virus dan patogen lain (Stricker,1993). Bila dipaparkan pada kulit, respon imun yang ditimbulkannya adalah hipersensitivitas tipe lambat (DTH) dengan sensitivitas yang menetap selama bertahun-tahun (Stites,1994). Reaksi DTH DNCB akan memperbaiki reaksi sel T secara umum dengan melibatkan inisiasi sel Th1 dan meningkatkan jumlah sel limfosit T sitotoksik. Penelitian Arts dkk (1996) menemukan bahwa paparan DNCB pada kulit telinga tikus menimbulkan penebalan kulit yang mengandung infiltrasi sel radang mononuklear. Secara mikroskopik, sel mononuklear terdiri dari limfosit dan makrofag. DNCB juga berperan dalam menginduksi ekspresi produk limfosit yaitu TNF- α dan IFN- γ (Dearman 1996). Pada penderita kanker, DNCB telah banyak digunakan sebagai sarana deteksi defisiensi imun seluler, namun belum ada penelitian yang mengamati DNCB untuk pencegahan kanker maupun penghambatan pertumbuhan kanker. Abbas (1997) berpendapat bahwa peningkatan respons limfosit T sitotoksik merupakan tujuan terapi anti tumor di masa yang akan datang. Dengan mengacu berbagai temuan diatas, DNCB sebagai imunostimulan diasumsikan dapat meningkatkan respons limfosit dan dapat dipakai untuk pencegahan kanker kulit.

Kanker kulit dengan berbagai penyebab telah dilaporkan oleh Sarjadi (1992), merupakan salah satu dari lima tumor ganas terbanyak pada pria dan wanita yang dilaporkan oleh pusat patologi anatomi di Indonesia. Di Semarang pada tahun 1990-1993, kanker kulit menempati urutan ke 5 (Ika PM, 1997). Kulit merupakan bagian tubuh paling luar yang biasa dilihat sehari-hari. Tidak wajarlah bila di daerah kulit tersebut di temukan tumor ganas, terlebih-lebih bila sudah dalam stadium lanjut. Penanggulangan kanker meliputi pencegahan dan pengobatan. Pengobatan kanker sering tidak berhasil pada penderita kanker stadium lanjut sehingga mengakibatkan kematian. Imunoterapi masih dalam ujicoba, dan manfaatnya cenderung meninggi bila diterapkan untuk pencegahan.

Pencegahan kanker dengan memanfaatkan respon imun tubuh dapat melibatkan sel yang berperan dalam sistim perondaan imun terhadap kanker, diantaranya adalah limfosit. Sebaran limfosit di sekitar sel kanker secara histologik mempunyai nilai prognostik yang baik karena kecepatan pertumbuhan sel kanker menurun. Secara *in vitro*, beberapa sel imun di sekitar sel kanker terbukti dapat membunuh sel kanker disekelilingnya (Constantinides, 1994). Hubungan antara banyaknya limfosit yang ditemukan diantara kelompok sel kanker secara histologik dengan prognosis penderita telah ditunjukkan pada kanker leher rahim (Sarjadi, 1985). Bila respon limfosit tersebut ditingkatkan sebelum sel kanker muncul dan membelah menjadi banyak, diharapkan dapat menghambat pertumbuhan kanker.

Berbagai keadaan diatas kiranya dapat dipelajari dan diterapkan dalam upaya pencegahan kanker kulit seperti yang dilaporkan oleh Ika PM & Sarjadi (1993) dalam studi pendahuluannya pada mencit C3H. 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 kanker secara mikroskopik, dan pada kelompok yang diberi DNCB diikuti dengan ter belum muncul kankernya. Meskipun belum dapat diuji kebenarannya secara statistik dan penilaian respon limfosit lokal yang terjadi belum dilakukan, hasil yang didapat memberi petunjuk bahwa karsinogenesis kanker kulit lebih lambat pada kelompok dengan DNCB. Asumsi yang timbul, DNCB dapat menghambat karsinogenesis kanker kulit melalui efek imunomodulatornya yang meningkatkan respon limfosit lokal. Sebelum membelah lebih lanjut, satu atau beberapa sel kanker akan dilawan oleh limfosit yang telah meningkat jumlahnya setelah diberi DNCB. Penelitian lanjutan tahap I menunjukkan bahwa 2 kelompok mencit yang diberi Ter dengan atau tanpa DNCB, epidermisnya dapat mengalami displasia berat (Ika PM, 2001). Untuk membuktikan bahwa DNCB dapat mencegah displasia berat berubah menjadi kanker invasif melalui sebaran limfosit intradermal, maka penelitian diatas akan dilanjutkan dengan melihat perbedaan sebaran limfosit lokal dan limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin pada epidermis yang mengalami displasia berat. Perforin berada dalam limfosit (sel T sitotoksik) dan sel NK (*Natural Killer*) yang akan dikeluarkan bila membunuh sel

kanker (Constatinides, 1994), dan sekaligus dapat menjadi *marker* untuk kedua sel tersebut (Kawasaki, 1990).

Rumusan Masalah :

Apakah ada perbedaan sebaran limfosit lokal dan limfosit intradermal yang mengekspresikan Perforin pada epidermis kelompok mencit C3H yang mengalami displasia berat setelah diberi Ter dengan dan tanpa paparan DNCB dosis 10 mikrogram pada kulit seluas 1,5 cm ?