

616.994
mir

p

01

DOSEN MUDA



LAPORAN PENELITIAN

**PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCB)
DALAM MENINGKATKAN RESPON LIMFOSIT LOKAL DAN
MENCEGAH TIMBULNYA KANKER KULIT AKIBAT
PAPARAN TER**

(Studi pada mencit C3H)

Oleh :

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

Biaya oleh Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumberdaya Manusia,
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Tahun Anggaran 2001

FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
OKTOBER 2001

UPT-PUSTAK-UNDIP

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR PENELITIAN DOSEN MUDA

1. Judul penelitian : Pengaruh *1-chloro-2,4-dinitrobenzene* (DNCB) dalam meningkatkan respon limfosit lokal untuk mencegah timbulnya kanker kulit akibat paparan ter (studi pada mencit C3H)

Kategori penelitian : Meningkatkan ketrampilan staf pengajar.

2. Ketua Peneliti

- a. Nama lengkap : Ika Pawitra Miranti,dr.
b. Jenis kelamin : Perempuan
c. Golongan / Pangkat / NIP : IIIb / Penata Muda tk. I / 131 875 465
d. Jabatan fungsional : Asisten Ahli
e. Fakultas / Jurusan : Kedokteran Umum
f. Pusat Penelitian : Bag. Patologi Anatomi FK UNDIP
g. Bidang Ilmu : Kesehatan / Patologi Anatomi
3. Jumlah Tim Peneliti : 3 orang
4. Lokasi Penelitian : Lab.Patologi Anatomi FK UNDIP
5. Kerjasama dengan institusi lain : -
6. Lama penelitian : 10 bulan
7. Biaya Penelitian : Rp. 5.000.000,- (tahun anggaran 2001)
-

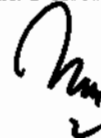
Semarang, 31 Oktober 2001



Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran UNDIP

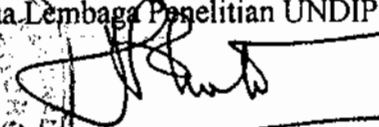
M. Anggoro DB Saonro, dr,DTM&H,SpAK
NIP. 130 354 793

Ketua Peneliti



Ika Pawitra Miranti, dr.
NIP. 131 875 465



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian UNDIP

Prof. Dr. dr. I. Riwanto, SpBD.
NIP. 130 529 454

RINGKASAN

PENGARUH 1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE (DNCB) DALAM MENINGKATKAN RESPON LIMFOSIT LOKAL DAN MENCEGAH TIMBULNYA KANKER KULIT AKIBAT PAPARAN TER
(Studi pada mencit C3H)

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

Kontrak no : 016 / LIT / BPPK-SDM / III / 2001 dengan Ditbinlitabnmas-Ditjen Dikti
(Laporan penelitian sebanyak 29 halaman)

DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) merupakan imunostimulan yang kuat meskipun cara penggunaannya hanya dipaparkan pada kulit. Berbagai penelitian menunjukkan DNCB menyebabkan terjadinya sekumpulan sel mononuklear dalam dermis, meningkatkan jumlah sel CTL dan sel NK, meningkatkan ekspresi TNF- α , dan produksi γ -IFN. Untuk penyakit kanker, DNCB hanya digunakan sebagai parameter defisiensi imun seluler. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membuktikan bahwa DNCB meningkatkan respon limfosit lokal dan mencegah kanker kulit pada mencit C3H yang terpapar karsinogen Ter.

Dengan metode penelitian *posttest-only randomized control group design*, tiga kelompok perlakuan masing-masing diberi campuran DNCB dan Ter ; Ter saja ; dan DNCB saja. DNCB 10 ug 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 Hematoksilin-Eosin untuk melihat perubahan epidermis dan sebaran limfosit. Data yang terkumpul dinyatakan dalam skor dan memakai uji normalitas Kolmogorov-Smirnov *Goodness of Fit Test*, uji beda Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok yang terpapar DNCB-Ter menunjukkan rata-rata skor limfosit lebih tinggi dari 3 kelompok lainnya, namun rata-rata skor sebaran limfosit untuk kedua kelompok yang masing-masing diberi DNCB saja dan Ter saja tidak berbeda bermakna. Prosentase terjadinya displasia pada kelompok Ter tanpa DNCB adalah lebih tinggi 2 kali lipat dibanding kelompok Ter dengan DNCB. Skor perubahan epidermis antara 3 kelompok perlakuan tidak berbeda

bermakna. Temuan diatas dapat disimpulkan bahwa DNCB dapat meningkatkan respon limfosit lokal, dan menurunkan prosentase terjadinya displasia.

SUMMARY

LOCAL LYMPHOCYTE RESPON AND SKIN CANCER PREVENTION USING *1-CHLORO-2,4-DINITROBENZENE* (DNCB) ON TAR-INDUCED C3H MOUSE SKIN

Ika Pawitra Miranti, Udadi Sadhana, Awal Prasetyo
Department of Anatomical Pathology Medical Faculty Diponegoro University

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, and the production of TNF- α and IFN- γ . In cancer, DNCB was only used as a parameter of cellular immune defeciencies. Based on our preliminary study, we are going to analyse that DNCB can increase local lymphocyte respons and prevent skin cancer on tar-induced C3H-mouse skin.

Using the posttest-only randomized control group design, each of three experimental groups was applied with DNCB and tar ; only DNCB ; and only tar. DNCB 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 and tested with Kolmogorov-Smirnov Goodness of Fit test, Kruskal-Wallis and Mann Whitney significance test.

The study showed that the lymphocyte mean score of the group with DNCB and Tar was higher than the other 3 groups. The mean score of lymphocyte infiltration of the two groups with DNCB only and Tar only were not significantly different. The percentage of displasia of the Tar-only group was twice higher than the same group with DNCB pretreatment. The epidermal score of the experimental groups were unsignificantly different.

We conclude that DNCB can increase the local lymphocyte respons and decrease the percentage of dysplasia as a first step of skin cancer delopment.

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. sebagai pembimbing 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.

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	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	7
IV. METODE PENELITIAN	8
V. HASIL DAN PEMBAHASAN	14
VI. KESIMPULAN DAN SARAN	19
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	22

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 5.1. : Distribusi skor sebaran limfosit dan perubahan epidermis	14
Tabel 5.2. : Perbedaan rata-rata sekor sebaran limfosit	15
Tabel 5.3. : Perbedaan rata-rata skor perubahan epidermis	16
Tabel 5.4. : Distribusi frekuensi skor perubahan epidermis antar kelompok mencit.	17

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lamp.1 : Gambaran mikroskopik perubahan epidermis dan respon limfosit	23
Lamp 2 : Curriculum vitae personalia penelitian	25
Lamp 3 : Anggaran penelitian	28

BAB I PENDAHULUAN

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.

DNCB (*1-chloro-2,4-dinitrobenzene*) adalah bahan kimia yang digunakan sebagai imunomodulator / stimulan sistim 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). Uji coba DNCB pada penderita penyakit HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) stadium dini menunjukkan peningkatan jumlah sel efektor imun, yang disertai penurunan replikasi virus (Stricker,1993). 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 (1994) 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 melalui jalur spesifik dan non spesifik, dan dapat dipakai untuk pencegahan kanker kulit.

Berbagai keadaan diatas kiranya dapat dipelajari dan diterapkan dalam upaya pencegahan kanker kulit seperti yang dilaporkan oleh Ika PM & Sarjadi (1993) dalam studi pendahulunya 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. Untuk membuktikan asumsi tersebut, maka penelitian diatas akan dilanjutkan dengan membandingkan respon limfosit lokal antar kelompok mencit perlakuan dan kontrol.

Rumusan Masalah :

Apakah DNCB dosis 10 mikrogram pada kulit seluas 1,5 cm dapat meningkatkan respon limfosit lokal dan mencegah timbulnya kanker kulit akibat paparan karsinogen ter pada mencit C3H ?