

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Karsinoma Epidermoid

2.1.1. ANATOMI DAN HISTOLOGI

Kulit merupakan suatu organ yang kompleks dan merupakan 15% dari total berat badan, terbentuk dari beberapa primordial sel. Kulit mempunyai daya tahan yang cukup kuat terhadap infeksi melalui system buffer yang berhubungan dengan lingkungan dan perubahan biokimia dari individu.

Kulit terdiri dari 3 lapisan tebal, yaitu :

1. Epidermoid, merupakan lapisan epitel yang berasal dari *ectodermal* dan disebut skuamus berlapis kompleks keratin, terdiri dari (*superficial* ke *profunda*) :

- a. *Stratum corneum*
- b. *Stratum lucidum*
- c. *Stratum granulosum*
- d. *Stratum spinosum*
- e. *Stratum basalis*

Stratum basalis terdiri dari sel-sel torak beberapa lapis yang berinti dimana semakin ke permukaan lapisan sel tersebut semakin gepeng sehingga pada *stratum lucidum* inti sel sudah menghilang, dan pada *stratum corneum* sel sudah kehilangan inti dan bentuk sehingga merupakan suatu lapisan amorph.

2. Dermis, merupakan lapisan pada kulit yang terdiri dari jaringan ikat, pembuluh darah, dan syaraf. Lapisan ini berasal dari lapisan *mesodermal*.

Lapisan ini terdiri dari dua stratum yaitu :

- a. *Stratum papilaris*, merupakan lapisan yang kaya pembuluh darah dan mempunyai proyeksi ke dalam epidermis berbentuk papilla.

b. *Stratum retikularis*, merupakan lapisan yang terdiri dari jaringan ikat.

Pada jaringan kulit terdapat beberapa apendik dari kulit, yaitu :

1. Rambut dan kuku
2. Kelenjar keringat (*eccrin*)
3. Kelenjar palit (*sabeca*)
4. Kelenjar appokrin (pada tempat tertentu)

Secara filosofis sel-sel dari *stratum basale* tumbuh ke permukaan kulit untuk kemudian menjadi lapisan *corneum* yang akan terlepas dari proses ini disebut keratinisasi. Bila *stratum corneum* menebal keadaan ini disebut *hyperkeratosis*, bila pada *stratum corneum* masih didapat sel-sel berinti maka keadaan ini disebut *parakeratosis*, sedang bila proses keratinisasi terjadi secara tidak beraturan pada lapisan kulit keadaan ini disebut *dyskeratosis* dan ini terjadi pada *karsinoma epidermoid*, ada pula istilah *acanthosis*, yaitu : bila terjadi penebalan dari *stratum spinosum* dan ini terjadi pada *veruca*.

2.1.2. INSIDENS

Secara umum kejadian keganasan pada kulit di beberapa tempat memberikan angka-angka yang berbeda, seperti di Belanda keganasan kulit mencapai 25% dari semua kasus keganasan dan ini sama dengan di Amerika Serikat, sedangkan di Australia mempunyai nilai lebih besar yaitu 50% dari semua keganasan yang dijumpai, Suryadi Gunawan dalam pengamatannya di 17 laboratorium Patologi Anatomi di seluruh Indonesia mendapatkan bahwa keganasan kulit menempati urutan ke-3 dari seluruh keganasan yang diperiksa pada laboratorium tersebut. Pada catatan medik di RSCM Jakarta pada tahun 1975-1978 keganasan kulit menempati urutan ke-4, sedangkan Sarjadi di Semarang mengemukakan bahwa keganasan kulit menduduki

urutan ke-3 dari seluruh keganasan pada wanita dan urutan ke-2 pada laki-laki. Himawan dkk, dalam penelitiannya mendapatkan bahwa karsinoma epidermoid berbanding dengan karsinoma sel basal adalah 2 : 3.

Di Amerika Serikat karsinoma epidermoid merupakan tumor ganas kulit non melanoma ke-2 terbanyak setelah basal sel karsinoma dan merupakan 20% dari seluruh keganasan pada kulit. Pada data dari American Cancer Society yang dikutip Yenifer dkk, didapat perbandingan antara karsinoma epidermoid dengan basal sel karsinoma adalah 1 : 7, sedangkan Marks pada tulisannya menyebutkan perbandingan karsinoma epidermoid dengan basal sel karsinoma adalah 1 : 4. David Brodland menyatakan bahwa karsinoma epidermoid merupakan keganasan kulit ke-2 terbanyak dan menyebutkan insidennya sebesar 38,8 / 100.000 orang. Pengamatan dari Yoseph Scoto dkk, dalam pengamatannya selama 6 bulan pada tahun 1970 mendapatkan jumlah penderita karsinoma epidermoid menempati urutan terendah dari seluruh kasus tumor ganas kulit yang diperiksa. Usia penderita dari karsinoma epidermoid umumnya antara 30-70 tahun dengan frekuensi terbanyak pada usia 40-60 tahun. Tumor ini terbanyak menyerang laki-laki dengan perbandingan penderita antara pria dan wanita adalah 2 : 1. Dari penelitian Karjalainen dkk, di Finlandia didapat pada lokasi di daerah muka lebih sering pada wanita dibandingkan dengan pria. Warna kulit diduga berpengaruh terhadap kejadian karsinoma epidermoid seperti yang disebutkan oleh Sherman dan Fleming dimana ini jarang didapat pada orang kulit hitam.

2.1.3. ETIOLOGI

Karsinoma epidermoid tumbuh dari sel normal lapisan epidermis yang sudah *mature* yang kemudian mengalami metaplasia, dimana perubahan tersebut tidak terjadi pada satu sel saja tetapi pada satu daerah yang mengandung sel tersebut.⁷ Secara

histologis disebutkan bahwa tumor ini tumbuh dari lapisan epitel skuamous epidermis kulit pada daerah tersebut. Etiologi dari tumor ini tidak jelas diketahui tetapi ada beberapa faktor yang berperan penting untuk terjadinya tumor ini yang sering disebut pula sebagai faktor resiko yaitu^{4,8,9,10} :

1. Faktor dalam :

- a. Usia
- b. Pigmentasi kulit
- c. Keadaan imunitas
- d. Kelainan genetik yang bermanifestasi pada kulit seperti Xeroderma Pigmentosa
- e. Adanya ulkus kronis, skar luka bakar, yang mengalami iritasi kronis.

2. Faktor luar :

- a. Paparan sinar matahari
- b. Infeksi virus
- c. Kontak dengan zat karsinogen
- d. Sinar radiasi

Dikatakan bahwa faktor-faktor tersebut tidak bekerja sendiri-sendiri tetapi merupakan multi faktorial yang bersama-sama atau sebagian menjadi penyebab timbulnya tumor ini pada individu⁷. Sinar matahari dikatakan merupakan faktor yang mempunyai peran cukup besar karena disebutkan bahwa sinar matahari menyebabkan perubahan actin dari sel epidermis kulit tetapi ini terutama pada orang-orang kulit putih¹⁰. Adanya penurunan jumlah pigmen kulit seperti penderita albino juga berpengaruh karena tidak adanya proteksi dari kulit terutama terhadap sinar ultra violet dari matahari. Faktor imunitas berpengaruh ini dapat dilihat oleh Frierson dimana dijumpai 6 dari 12 penderita Lymphocytik Lymphoma¹⁰, Hardie dalam pengamatan terhadap penderita yang mendapatkan organ graft mendapatkan 30-40% keganasan

yang timbul pada penderita tersebut adalah karsinoma epidermoid, tetapi Lobo dkk, menyebutkan dalam penelitian mereka bahwa karsinoma epidermoid yang timbul tidak berhubungan terjadinya immunosupresi akibat infeksi virus¹. Timbulnya tumor ini pada tempat dimana terdapat ulkus kronis adalah akibat beradaptasinya tempat tersebut terhadap rangsangan kronis sehingga terjadi displasia dari sel pada daerah itu yang pada suatu saat dapat berubah menjadi ganas.

2.1.4. LOKASI ANATOMI

Predileksi dari tumor ini adalah pada daerah muka, leher, tangan, kemungkinan ini ada hubungannya dengan paparan sinar matahari pada tubuh manusia^{7,8}. Lokasi anatomi dari tumor ini dikatakan berpengaruh terhadap timbulnya kekambuhan, disebutkan pada daerah *medial canthus*, *alar fold*, daerah belakang telinga, daerah dahi sebelah lateral mempunyai kemungkinan untuk terjadi kekambuhan, hal ini disebabkan karena pada daerah tersebut tumor dapat menyebar pada beberapa lapisan di bawah lapisan kulit sehingga gambaran klinis tidak sesuai dengan keadaan tumor sebenarnya dan ini mempengaruhi pilihan tindakan yang mungkin tidak terlalu agresif.

2.1.5. KLASIFIKASI DAN STAGING

Klasifikasi dari karsinoma epidermoid mempergunakan sistem TNM dari UICC, yaitu⁷ :

T untuk besar dari tumor primer, dibagi atas :

Tx í í Keadaan awal, tumor sulit dijumpai

Tis í í Karsinoma in Situ

T0 í í Tumor primer tidak ada

- T1 í í Diameter tumor sebesar < 2 cm, terletak *superficial* atau tumbuh exopitik.
- T2 í í Diameter tumor sebesar 2-5 cm atau sudah ada infiltrasi ke dermis.
- T3 í í Diameter tumor sebesar > 5 cm, atau tumor dengan infiltrasi dalam pada dermis.
- T4 í í Tumor yang sudah mengenai unsur lain seperti fascia, otot, rawan, tulang.

Diameter dari tumor juga berpengaruh terhadap timbulnya metafase dan terjadinya kekambuhan karena pada lesi yang luas umumnya gambaran diferensiasinya menjadi lebih jelek dan dikatakan pada diferensiasi yang moderat dan buruk kemungkinan terjadinya kekambuhan menjadi lebih besar^{11,12}. Sedangkan pengamatan dari Frierson dan Cooper mendapatkan bahwa semakin dalam infiltrasi dari tumor maka kemungkinan terjadinya metastase dan kekambuhan menjadi lebih besar.

N untuk limfodi yang terkena, dibagi atas :

- Nx í í Ada penyebaran tetapi tidak dijumpai pembesaran kelenjar limfe
- N0 í í Tidak dijumpai kelenjar limfe regional yang membesar
- N1 í í Ada pembesaran kelenjar limfe regional yang homo lateral dan mobil.
- N2 í í Ada pembesaran kelenjar limfe regional yang bilateral atau adanya kelenjar limfe kontra lateral yang membesar
- N3 í í Di dapat pembesaran kelenjar limfe regional dan pada perabaan fixed.

M untuk metastase jauh yang terjadi

Mx í í Kemungkinan ada metastase tetapi tidak didapat

M0 í í Tidak ada metastase jauh

M1 í í Ada metastase jauh pada organ lain

Untuk staging dari tumor ini yang dipergunakan sekarang adalah dengan sistem TNM, yaitu :

Stage 1 = T1 N0 M0

Stage 2 = T2 ó T4 N0 M0

Stage 3 = T4 N1 M0 atau T1 ó T4 N1 ó N3 M0

Stage 4 = T1 ó T4 N0 ó N3 dan M1

Staging klinis ini berpengaruh terhadap kekambuhan karena pada staging yang lebih tinggi dimana sudah terjadi metastase pada kelenjar limfe regional maupun T dari tumor yang lebih tinggi menyebabkan infiltrasi sel tumor yang luas sehingga walaupun tumor ini masih operable tetapi tidak menjamin bersihnya tempat tumor tersebut paska operasi dan ini memungkinkan terjadinya kekambuhan.

Berdasarkan gambaran histologist dipergunakan klasifikasi dari Broders yaitu^{7,8} :

Derajat 1 í í Sel yang berdiferensiasi baik > 75%

Derajat 2 í í Sel yang berdiferensiasi baik antara 50% - 75%

Derajat 3 í í Sel yang berdiferensiasi baik antara 25% - 50%

Derajat 4 í í Sel yang berdiferensiasi baik < 25%

Dari penelitian Immerman dkk, didapat dari 17 penderita yang mengalami kekambuhan yang derajat diferensiasinya moderat dan buruk adalah 51%⁶ dan tampaknya terdapat hubungan antara derajat diferensiasi dengan kemungkinan terjadinya kekambuhan.

2.1.6. GAMBARAN KLINIS

Karsinoma epidermoid mempunyai predileksi pada tempat-tempat di tubuh yang sering terkena matahari^{7,8}, walaupun dapat terjadi pada tempat di tubuh yang lain. Lokasi yang tersering adalah pada daerah kepala termasuk wajah, leher, dan telapak tangan. Gambaran makroskopis dari tumor ini dapat berupa^{7,8} :

Nodul berwarna sama dengan kulit normal dengan permukaan rata tanpa krusta dengan batas yang tidak terlalu jelas tanpa rasa nyeri.

Nodul kemerahan dengan permukaan yang papilomatous atau disebut gambaran seperti bunga kol (cauliflower ó like).

Gambaran berbentuk ulkus dengan krusta pada permukaan dan tepi dari luka mneninggi berwarna kemerahan dan mudah berdarah tetapi tidak nyeri serta berbau busuk.

Dari beberapa gambaran tersebut yang tersering adalah gambaran seperti bunga kol hal ini mungkin penderita pada stadium awal belum menyadari karena gambaran awal dari tumor ini tidak terlalu khas. Pertumbuhan tumor ini dari lesi awal dikatakan cukup cepat^{7,8,13} walaupun kemungkinan metastasenya tidak terlalu besar.

2.1.7. DIAGNOSIS

Diagnosis dari karsinoma epidermoid dapat dilakukan secara klinis dan pemeriksaan PA^{7,8,14}. Klinis dengan berpatokan pada gejala yang telah disebutkan sebelumnya sedangkan untuk diagnose pasti dapat dengan Patologi Anatomi dari biopsi lesi tersebut. Hal yang perlu diperhatikan dalam mengambil anamnesis dari penderita tentang lama waktu timbulnya kelainan tersebut sebab walaupun ukuran tumor sama besar tetapi bila diderita baru 3 bulan akan berbeda perihal perubahan biologic dengan mereka yang menderita 3 tahun³. Bentuk lesi dikatakan pula

mempunyai pengaruh terhadap derajat diferensiasi dari tumor seperti bila tumor bentuk exopitik diduga akan mempunyai derajat diferensiasi lebih baik dibandingkan lesi yang berbentuk ulkus⁵.

2.1.8. PENANGANAN

Prinsip penanganan pada karsinoma epidermoid adalah sebagai berikut :

1. PEMBEDAHAN

Merupakan tindakan pilihan utama dan biasa dilakukan terhadap lesi yang kecil maupun besar. Pembedahan harus dilakukan dengan pembiusan total sedangkan pembiusan lokal tidak dianjurkan karena dengan pembiusan lokal maka dapat terjadi penyeberangan dari sel-sel tumor mengikuti ujung jarum suntik yang dipergunakan. Pembedahan yang dilakukan sebagai terapi dari karsinoma epidermoid adalah eksisi luas dengan batas irisan dari tepi tumor sebesar 2 cm atau lebih, ada beberapa ahli yang mengatakan bila diameter terpanjang dari tumor tersebut < 2 cm, maka irisan cukup 1 cm dari tepi tumor, sedangkan bila diameter terpanjang dari tumor tersebut > 2 cm, maka dianjurkan untuk melakukan irisan 2 cm atau lebih. Pada waktu melakukan eksisi dianjurkan untuk sekaligus mengangkat jaringan lemak subkutis karena 30% dijumpai adanya invasi sel tumor pada jaringan lemak tersebut. Hal ini untuk menghindari terjadinya kekambuhan¹¹. Penanganan terhadap luka pasca eksisi dapat dilakukan penutupan primer hanya dianjurkan jangan melakukan pembebasan jaringan subkutis bila luka lebar tapi disarankan untuk melakukan tandur kulit, hal ini untuk mengurangi terjadinya skar ataupun sikatrik yang dapat merupakan faktor predisposisi untuk terjadinya kekambuhan⁹. Keuntungan tindakan pembedahan antara lain⁷ :

- Dapat dilakukan pada tumor yang kecil maupun besar

- Dapat dilakukan pada kasus yang redisif
- Jaringan bawah kulit yang terkena dapat sekaligus dieksisi

Kerugian dari tindakan pembedahan adalah sebagai berikut :

- Tidak dapat dilakukan untuk penderita yang tidak diperbolehkan operasi.
- Lokasi tumor yang bila dilakukan eksisi dapat menimbulkan problem baru (seperti di daerah *palpebra inferior*) dan kemungkinan kekambuhan karena tidak bersihnya daerah tersebut dari sel tumor.

Hugo dan D'Amico mengatakan bahwa lebih dari 90% kasus kekambuhan terjadi pada kurun waktu 36 bulan setelah tindakan, sedangkan Immerman menyebutkan bahwa waktu kemungkinan terjadinya kekambuhan berkisar antara 3 bulan sampai dengan 5 tahun¹².

2. RADIOTERAPI

Radioterapi pada penderita karsinoma epidermoid dianjurkan diberikan pada penderita yang lesi tumor terletak pada daerah yang sulit bila dilakukan pembedahan ataupun pada penderita yang sudah dilakukan eksisi dan tidak dapat melakukan irisan pada jarak 2 cm dari tumor. Dosis total yang dianjurkan adalah 4000 ó 4500 rad, yang diberikan 300 rad/ hari dan lama pemberian adalah 2 sampai 3 minggu.

3. SITOSTATIKA

Modalitas terapi ini dianjurkan sebagai salah satu terapi tambahan dan terutama untuk kasus dengan adanya metastase sistemik, juga pada penderita dengan lesi pada tempat sulit untuk melakukan eksisi 2 cm dari tepi tumor. Adapun yang dipergunakan untuk terapi ini adalah *Bleomysin* dengan dosis 15-30 mg/m² luas permukaan badan, dengan pemberian 2 minggu sekali, bisa juga dengan dosis 7,5-15 mg/m² luas permukaan badan tiap hari dalam 24 jam selama 5 hari berturut-turut.

Bareta menganjurkan pemberian *Adrimicyne* dengan dosis 50 mg/m² luas permukaan badan dan *Platinum – Cis* dengan dosis 75 mg/m² luas permukaan badan dengan pemberian setiap 3 minggu sekali dengan jumlah siklus 3 kali. Cisplatin merupakan regimen kemoterapi yang direkomendasikan penggunaannya untuk non melanoma skuamous sel karsinoma. Kombinasi cisplatin dengan paclitaxel, doxorubicin, bleomycin, atau 5- fluorouracil (5-FU) secara luas telah digunakan sebagai terapi untuk karsinoma epidermoid dengan lesi yang luas dan bermetastasis. Cisplatin bekerja dengan mekanisme menghambat *crosslink* dari DNA, dan secara aktif mengganggu siklus sel. Pada kasus karsinoma epidermoid dapat diberikan dengan dosis 50 ó 100 mg/m² perhari atau 15 ó 20 mg/m² perhari selama 5 hari, dan diulang dengan interval waktu setiap 3-4 minggu. Paclitaxel menunjukkan aktivitas yang impresif pada kanker ovarium stadium lanjut, payudara, paru, esophagus , kandung kemih dan kanker kepala leher. Paclitaxel dikembangkan sebagai terapi lini pertama dan kombinasi dengan cisplatin pada karsinoma epidermoid. Paclitaxel berkerja dengan menghambat proliferasi sel dengan menginduksi blok mitosis pada metafase / anafase, sehingga membentuk lempeng metafase yang inkomplit pada kromosom dan pengaturan spindel microtubule menjadi abnormal. Paclitaxel umumnya diberikan dengan dosis 135-175 mg/m² lebih dari 24 jam setiap tiga minggu. Kombinasi paclitaxel dan cisplatin terutama pada karsinoma epidermoid dan karsinoma sel skuamous kepala leher, sebanding dengan kombinasi docetaxel dan cisplatin, dimana kedua kombinasi tersebut memberikan respon parsial 50 %, dan hanya sedikit yang memberikan respon komplet.²²

2.1.9. Perkembangan massa tumor :

Perkembangan massa tumor dengan dua cara yaitu²⁴ :

- a. Secara eksponensial yaitu dari satu sel menjadi 2 sel, 4 sel, 8 sel, dan seterusnya sampai menjadi 2^n sel sampai terbentuk gerombolan sel tumor. Makin besar tumor makin cepat tumor itu tumbuh. Untuk mengukur kecepatannya tumbuh dipakai parameter waktu ganda (doubling time) yaitu waktu yang di perlukan oleh suatu tumor untuk membesar sehingga volumenya menjadi dua kali semula. Setelah tumor mencapai ukuran tertentu pertumbuhan tumor beralih ke pertumbuhan gompertz.
- b. Pertumbuhan gompertz yaitu pertumbuhan melambat dengan makin besarnya tumor, karena keterbatasan pasokan darah, ruang tumbuh dan daya imunitas tubuh. Jadi didalam suatu tumor selalu ada kelompok sel yang tumbuh, sel yang tidak tumbuh dan ada kelompok sel yang hilang karena mati.

Faktor yang mempengaruhi kecepatan tumbuh tumor payudara²⁴ :

- a. Faktor penderita :
 - umur penderita : pada usia muda umumnya pertumbuhan lebih cepat.
 - Jenis kelamin : pertumbuhan pada wanita lebih cepat karena di pengaruhi oleh hormon estrogen.
 - Imunitas penderita.
- b. Faktor tumor :
 - derajat keganasan tumor.
 - Rasio sel yang tumbuh di banding sel yang tidak tumbuh dan sel yang mati.

2.2. Respons imunologik terhadap sel tumor

Respons imun merupakan hasil interaksi antara antigen dengan sel-sel *imunokompeten*, termasuk mediator-mediator yang dihasilkannya. Limfosit merupakan unit dasar terbentuknya respons imun karena mampu berdiferensiasi menjadi seri lainnya serta mengenal sekaligus bereaksi dengan antigen. Sel mononuklear yaitu CTL dan sel NK dapat bertindak sebagai *efektor* dalam respon imun dan berperan sebagai regulator respon imun karena kemampuannya dalam mempengaruhi aktivitas sel *imunokompeten* lainnya melalui limfokin yang dilepaskannya. ^{4,15,16,17}

Fungsi sistem imun adalah fungsi protektif dengan mengenal dan menghancurkan sel-sel abnormal itu sebelum berkembang menjadi tumor atau membunuhnya kalau tumor itu sudah tumbuh. Peran sistem imun ini disebut *immune surveillance*, oleh karena itu maka sel-sel efektor seperti limfosit T-*sitotoksik* dan sel NK harus mampu mengenal antigen tumor dan memperantarai / menyebabkan kematian sel-sel tumor. ^{4,18}

Beberapa bukti yang mendukung bahwa ada peran sistem imun dalam melawan tumor ganas diperoleh dari beberapa penelitian diantaranya :

- 1) Banyak tumor mengandung infiltrasi sel-sel mononuklear yang terdiri atas sel T, Sel NK dan Makrofag;
- 2) Tumor dapat mengalami regresi secara spontan;
- 3) Tumor lebih sering berkembang pada individu dengan *imunodefisiensi* bahkan *imunosupresi* seringkali mendahului pertumbuhan tumor;

Bukti lain yang juga mendukung bahwa tumor dapat merangsang *sistem* imun adalah ditemukannya limfosit berproliferasi dalam kelenjar getah bening. Kelenjar getah bening ini merupakan *draining sites* dari pertumbuhan tumor disertai peningkatan ekspresi MHC dan *Interseleuler adhesion molecule* (ICAM) yang mengindikasikan sistem imun yang aktif.

^{4,15,16,19}

Sel imun yang berada di sekitar sel kanker yang berperan dalam perondaan terhadap kanker adalah CTL, Sel NK dan makrofag . Setelah mengenal sel kanker sebagai sel asing, ketiga sel imun tersebut akan menghancurkan sel kanker. ^{4,16,18,19}

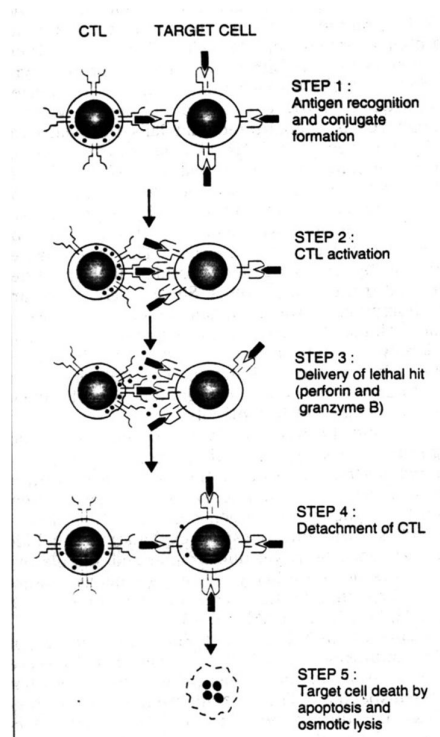
Sel CTL dan sel NK melakukan cara sitotoksitas yang sama yaitu dengan mengeluarkan *perforin* dan *granzyme* ^{4,18}. Dalam memproses antigen tumor *in vivo* akan melibatkan baik respon imun humoral maupun seluler. Sampai saat ini belum ada bukti antibodi secara sendiri dapat menghambat perkembangan atau pertumbuhan sel tumor. Dengan demikian respon imun humoral dalam bentuk antibodi terhadap tumor selalu memerlukan bantuan efektor imun seluler. ^{4,15,18} Komponen efektor pada sistem imun yang memiliki kemampuan bereaksi dengan sel tumor ialah limfosit T, *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC), sel NK dan makrofag ^{4,18,20,21}

2.3. Mekanisme efektor dalam melawan tumor

2.3.1. Limfosit T sebagai efektor anti tumor

Subpopulasi limfosit T ; limfosit *T-helper* dan CTL sama-sama berperan dalam mengeliminasi antigen tumor. Sel yang mengandung antigen tumor akan mengekspresikan antigennya bersama molekul MHC kelas I yang kemudian membentuk kompleks melalui TCR (*T-cell Receptor*) dari sel T-sitotoksik, mengaktivasi sel T-sitotoksik untuk menghancurkan sel tumor tersebut. Sebagian kecil dari sel tumor juga mengekspresikan antigen tumor bersama molekul MHC kelas II, sehingga dapat dikenali dan membentuk kompleks dengan limfosit *T-helper* (CD4) dan mengaktivasi sel *T-helper* terutama *subset* Th1 untuk mensekresi limfokin IFN- γ dan TNF- α . Kedua sitokin ini akan merangsang sel tumor untuk lebih banyak lagi mengekspresikan molekul MHC kelas I, sehingga akan lebih mengoptimalkan sitotoksitas dari sel T-sitotoksik . ^{4,18,20,21}

Pada banyak penelitian terbukti bahwa sebagian besar sel Efektor yang berperan dalam mekanisme anti tumor adalah CTL yang berperan untuk membunuh sel yang terinfeksi virus atau sel *alogenik*. CTL dapat melakukan fungsi *surveillance* dengan mengenal dan membunuh sel-sel potensial ganas yang mengekspresikan peptida yang berasal dari protein seluler mutant atau protein virus onkogenik yang dipresentasikan oleh molekul MHC kelas I. Limfosit T yang menginfiltrasi jaringan tumor (*Tumor Infiltrating Lymphocyte* = TIL) juga mengandung sel CTL yang memiliki kemampuan melisiskan sel tumor. Walaupun respon CTL mungkin tidak efektif untuk menghancurkan tumor, peningkatan respons CTL merupakan cara pendekatan terapi antitumor yang menjanjikan dimasa mendatang. Sel T CD4⁺ pada umumnya tidak bersifat sitotoksik bagi tumor, tetapi sel-sel itu dapat berperan dalam respon antitumor dengan memproduksi berbagai *sitokin* yang diperlukan untuk perkembangan sel-sel CTL menjadi sel Efektor. Di samping itu sel T CD4⁺ yang diaktifasi oleh antigen tumor dapat mensekresi TNF dan IFN yang mampu meningkatkan ekspresi molekul MHC kelas I sehingga meningkatkan sensitivitas tumor terhadap lisis oleh sel CTL. Sebagian kecil tumor yang mengekspresikan MHC kelas II dapat mengaktivasi sel CD4⁺ spesifik tumor secara langsung, yang lebih sering terjadi adalah bahwa APC professional yang mengekspresikan molekul MHC kelas II memfagositosis, memproses dan menampilkan protein yang berasal dari se-sel tumor yang mati kepada sel T CD4⁺, sehingga terjadi aktivasi sel-sel tersebut¹². Proses sitolitik CTL terhadap sel target dengan penggunaan enzim *perforin dan granzyme*. Ada beberapa langkah proses sitolitik CTL terhadap sel target. ^{4,18,20,21}



Gambar-1. Tahapan sitolitik sel target oleh CTLs. ⁸

2.3.2. Sel Natural Killer (NK) sebagai efektor anti tumor

Sel NK merupakan komponen utama dari *immune surveillance*, yang dapat bekerja sebagai sel efektor dari imunitas natural maupun spesifik / adaptif. Mekanisme Efektor sel NK mirip dengan sel T- sitotoksik, yang membedakan adalah bahwa sel NK melakukan sitotoksitas terhadap sel tumor tanpa melalui ekspresi antigen tumor bersama molekul MHC kelas I (MHC-unrestricted manner). Secara *in vitro*, sel NK dapat menginduksi apoptosis sel terinfeksi virus dan *cell line* dari tumor terutama tumor hematopoetik. Sebagian dari populasi sel NK dapat melisis sel target yang diopsonisasi oleh antibodi, terutama dari kelas IgG karena sel NK memiliki reseptor Fc γ RIII atau CD16 untuk Fc dari IgG. Kapasitas tumorisidal dari sel NK akan ditingkatkan oleh berbagai *sitokin*, diantaranya IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Konsep ini diadaptasikan dalam imunoterapi tumor menggunakan LAK (*Lymphokine-activated*

Killer), yaitu sel mononuklear perifer yang dikultur secara *in vitro* dengan penambahan IL-2 dosis tinggi.^{4,18,20,21,22}

Sitotoksitas alami yang diperankan oleh sel NK merupakan mekanisme efektor yang sangat penting dalam melawan tumor. Sel NK adalah sel efektor dengan sitotoksitas spontan terhadap berbagai jenis sel sasaran dan sitotoksitasnya tidak bergantung pada MHC.^{4,18,20,21}

Sel NK dapat berperan baik dalam respons imun nonspesifik maupun spesifik terhadap tumor, dapat diaktivasi langsung melalui pengenalan antigen tumor atau sebagai akibat aktivitas sitokin yang diproduksi oleh limfosit T spesifik tumor. Mekanisme lisis yang digunakan sama dengan mekanisme yang digunakan oleh CTL untuk membunuh sel, tetapi sel NK tidak mengekspresikan TCR dan mempunyai rentang spesifisitas yang lebar. Sel NK dapat membunuh sel terinfeksi virus dan sel-sel tumor tertentu, khususnya tumor hemopoetik, *in vitro*. Sel NK dapat diarahkan untuk melisis sel yang dilapisi *immunoglobulin* karena ia mempunyai reseptor Fc (FcRIII atau CD 16) untuk molekul IgG. Disamping itu penelitian-penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pengikatan sel NK pada sel sasaran juga dapat terjadi melalui reseptor khusus yang berbeda dengan reseptor Fc, yaitu reseptor NKR-K, yang mengikat molekul semacam lektin^{4,18,20,21,22}

Aktivitas sel NK dihambat oleh antigen HLA-G yang diekspresikan oleh sel tumor, tetapi sel tumor jarang yang mengekspresikan antigen HLA-G. Transkripsi HLA-G berupa mRNA cukup sering dijumpai pada berbagai jenis tumor, sehingga diduga ekspresi antigen HLA-G dikontrol ditingkat pasca transkripsi.^{4,18,22}

Kemampuan sel NK membunuh sel tumor ditingkatkan oleh sitokin, termasuk IFN, TNF, IL-2 dan IL-12. Karena itu peran sel NK dalam aktivitas anti tumor bergantung pada rangsangan yang terjadi secara bersamaan pada sel T dan makrofag

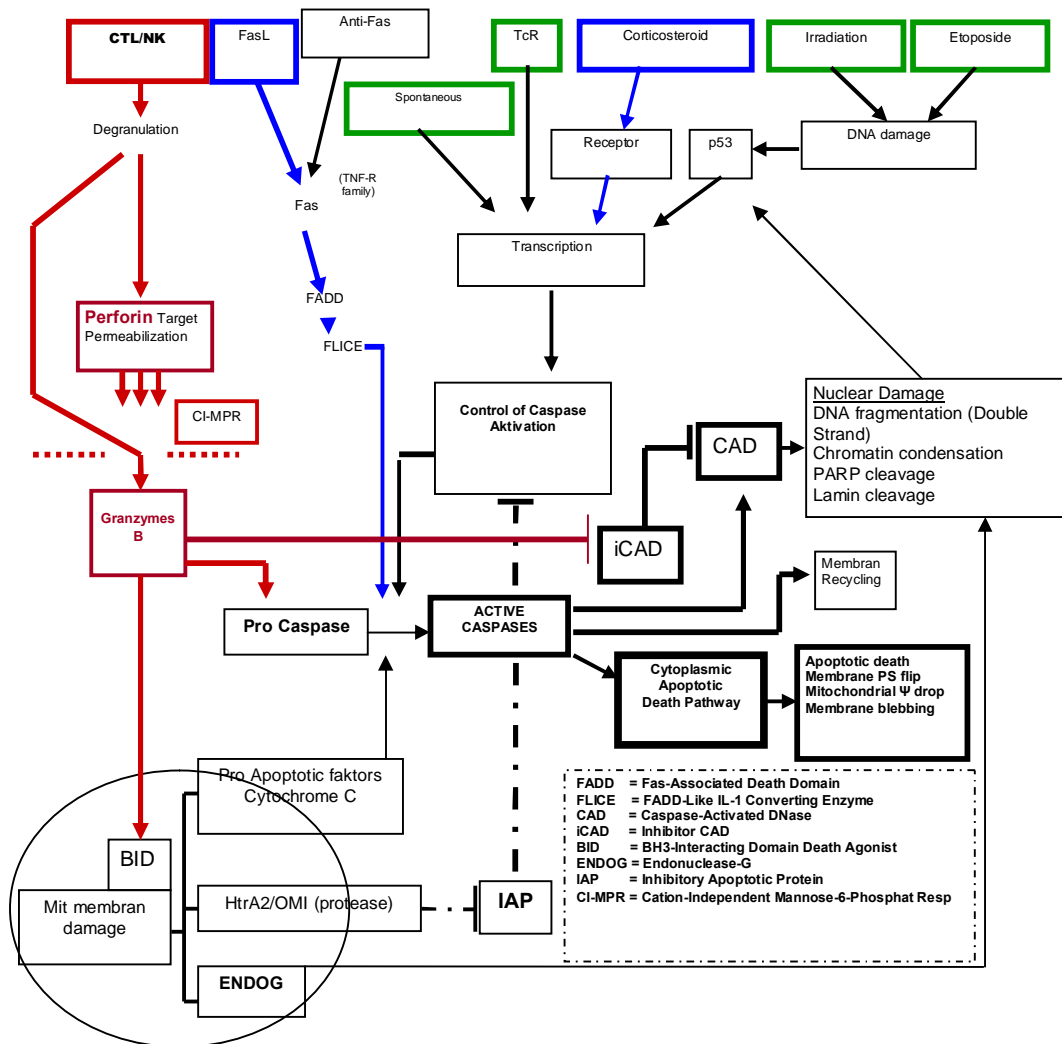
yang memproduksi sitokin tersebut.⁴ Ketiga jenis IFN (, ,) dapat meningkatkan fungsi sel NK. IFN mengubah pre-NK menjadi sel NK yang mampu mempermudah interaksi dengan antigen tumor dan lisis sel sasaran. Sel NK mungkin berperan dalam *immune surveillance* terhadap tumor yang sedang tumbuh, khususnya tumor yang mengekspresikan antigen virus. Aktivitas sel NK sering dihubungkan dengan prognosis. Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ada korelasi antara penurunan kemampuan sitotoksitas sel NK dengan peningkatan resiko metastasis. Dari penelitian-penelitian itu disimpulkan bahwa sitotoksitas alami dapat berperan dalam mencegah pertumbuhan kanker dan metastasis.^{4,18,22,23} Yang menarik adalah peran sel NK yang diaktifkan dengan stimulasi IL-2 dalam membunuh sel tumor. Sel-sel itu yang disebut *lymphokine activated killer cells* (LAK cells) dapat diperoleh *in vitro* dengan memberikan IL-2 dosis tinggi pada biakan sel-sel limfosit darah perifer atau sel-sel *Tumor Infiltrating Lymphocytes* (TIL) yang berasal dari penderita kanker. Sel-sel yang diaktifkan oleh limfokin (LAK cells) menunjukkan peningkatan aktivitas sitotoksik yang sangat jelas. Besar kemungkinan bahwa sel LAK dapat digunakan dikemudian hari dalam imunoterapi adaptif^{4,21,22}.

Sel NK juga mempunyai peran penting dalam mencegah metastasis dengan mengeliminasi sel tumor yang terdapat dalam sirkulasi. Hal itu dibuktikan dengan berbagai penelitian. Salah satu diantaranya mengungkapkan bahwa 90-99% sel tumor yang dimasukkan intravena akan hilang dalam 24 jam pertama, dan hal ini mempunyai hubungan bermakna dengan jumlah dan aktivitas sel NK. Percobaan menggunakan NK yang di-aktivasi dengan cyclophosphamide (cy) menunjukkan bahwa sel-sel itu gagal mencegah metastasis^{4,20}.

Setelah mengenal sel tumor dengan caranya masing-masing, CTL dan sel NK melepas granula azurofilik. Granula ini akan menyelubungi sel target, kemudian akan

bersatu dengan membrane sel target (*eksositosis*)^{3,16,19}. Granula CTL dan sel NK mengandung *perforin*, *sitotoksin*, *serine esterase* (*granzyme*) dan *proteoglikan*⁴. Perforin akan menimbulkan lubang pada membran sel target (sel tumor), dimana lubang tersebut merupakan pintu masuk bagi molekul sitotoksik lainnya dalam sitoplasma dan inti sel yang menyebabkan kematian dari sel target.^{2,4,22,24,25,26}

Dalam membunuh sel target ini melibatkan ekspresi permukaan FAS Ligan yang dipengaruhi reseptor, yang dapat mengakibatkan *cross link* sel target sehingga memicu kematian endogen (dikaitkan dengan apoptosis).^{6,15,20,24,27} secara bersama-sama jalur granula (*eksositosis* dan FASL). *Granzyme* akan mengaktifkan procaspase endogen pada sel target. Aktifitas *caspace* merupakan bagian dari jalur kematian *apoptosis* pada umumnya. *Inhibitor caspace* akan menghambat *apoptosis* dari jalur rusaknya nukleus; tetapi tidak menghambat apoptosis karena kerusakan yang bukan dari kerusakan inti tetapi hilangnya mitokondria potensial.^{4,23,24,28}



Gambar 2. Jalur Apoptosis sel target yang di induksi oleh Granzyme B^{13,30,34}

2.4 Granzyme

Granzyme merupakan molekul yang termasuk dalam famili serin protease, yang diekspresikan secara eksklusif oleh sel mononuklear (CTL dan sel-NK) yang merupakan komponen sistem imun terhadap virus dan transformasi sel pada organisme tingkat tinggi. *Granzyme* ini terdiri dari *granzyme* B, *granzyme* A,C,D,E,F,G,H, dan M. *Granzyme* B merupakan pro-apoptosis yang paling kuat dibandingkan dengan anggota *granzyme-granzyme* yang lain. *Granzyme* telah diteliti dengan baik hanya pada manusia dan tikus. Pada

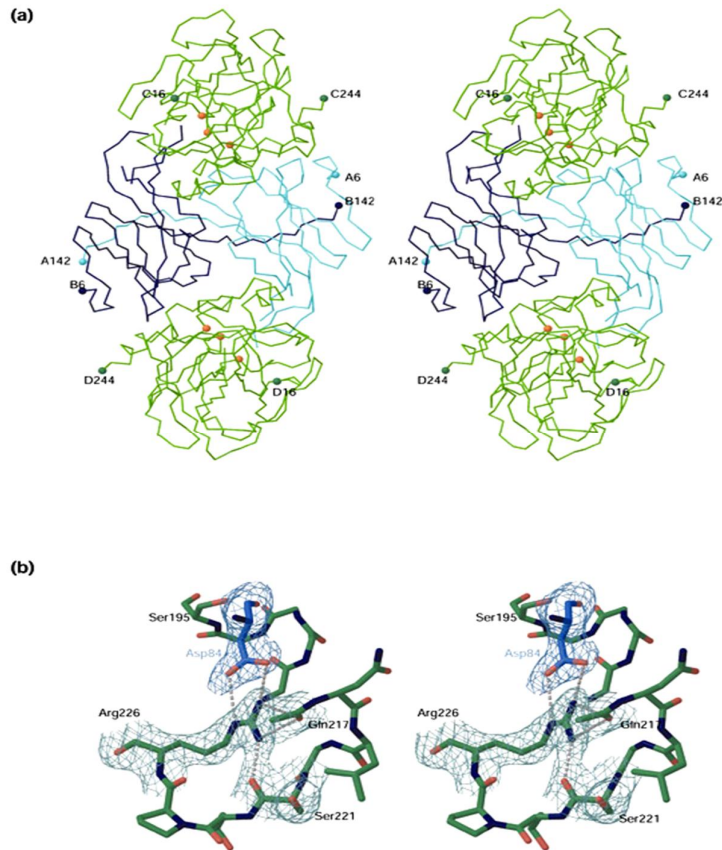
tikus dan manusia, *granzyme* B teridentifikasi mempunyai level lebih dari 70% dari level keseluruhan *granzyme-granzyme* lain.^{28,29}

Granzyme merupakan 90% total massa granula sitolitik, khususnya *secretory lysosome* dari CTL dan sel NK. Secara struktur kimiawi sangat dekat dengan *chymotrypsin*, dengan tiga residu kunci pada *catalytic site*-nya yaitu histidin, asam aspartat, dan serin. Pada tikus diidentifikasi 8 macam *granzym* yaitu *granzyme* A-G dan M, sedangkan pada manusia diidentifikasi *granzyme* B, A, H, M dan *granzyme*-3 atau *tryptase*-2.^{28,29}

Pada gambar-3 menunjukkan struktur dari *granzyme* B. Gambar (a) menunjukkan 2 buah molekul kompleks *granzyme* (C46-C244,D244-D46) dengan sebuah dimer inhibitor *ecotin* (B6-B142,A142-A6). *Catalytic site* *granzyme* B terdapat pada daerah pertengahan (C46-C244,D244-D46). Pada (b) terlihat tempat-tempat *catalytic site* (Gln217,Ser221,Arg226,Ser195).^{28,29}

Granzyme dapat digolongkan menjadi tiga subfamili menurut spesifitas substratnya yaitu:

1. Golongan *granzyme* yang mempunyai aktifitas enzimatik menyerupai serin protease *chymotrypsin* dan secara genetik di *encoding* pada lokus *chymase*.
2. Golongan *granzyme* dengan aktifitas spesifik *trypsin-like* dan secara genetik di *encoding* pada lokus *tryptase*.
3. Subfamili *granzyme* yang memecah residu hidropobik, terutama methionin. Secara genetik di *encoding* pada lokus *Met-ase*.



Gambar-3. Struktur kristal kimia dari *granzyme B*.²⁹

Seluruh *granzyme* disintesis sebagai zymogen, dan setelah berikatan dengan peptida utama, aktifitas enzimatis maksimal diperoleh dengan lepasnya sebuah dipeptida amino terminal. Seluruh aktivitas *granzyme* ini dapat dihambat oleh inhibitor serin protease, dan inhibitor yang terbaru diidentifikasi adalah *serpin* yang spesifik untuk *granzyme*. Ekspresi *granzyme* dapat diukur melalui plasma dengan metoda ELISA, tetapi dapat diukur ekspresinya melalui pengecatan immunohistokimia dengan *monoklonal antibodi anti granzyme*.^{28,29}

2.5 Mahkotadewa

Mahkotadewa dalam bahasa latin di kenal dengan istilah *Phaleria macrocarpa* termasuk dalam familia *Thymelaeaceae*. Kajian pustaka yang telah ada menyebutkan bahwa genus *Phaleria* umumnya memiliki aktifitas antimikroba, hal ini berkaitan dengan toksisitas

tanaman yang cukup tinggi untuk pertahanan diri. Adanya aktifitas antimikroba ini berhubungan dengan potensi antikanker terhadap sel pada siklus tertentu.²

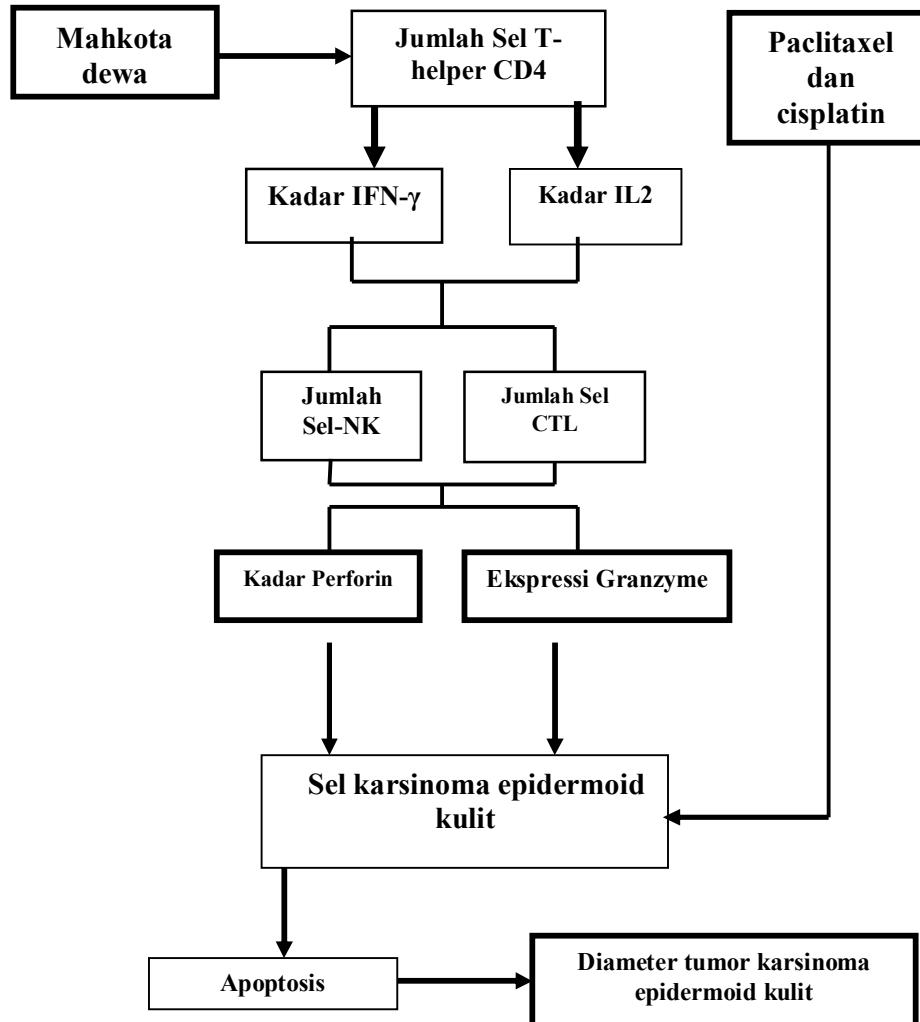


Gambar-4. Buah Mahkotadewa.²

Ekstrak terhadap daging buah dan kulit biji mahkotadewa menunjukkan adanya zat aktif *polyphenol*, *alkaloid*, *terpenoid* dan *saponin*^{2,3}. Pengujian dengan larva udang *Artemia salina* Leach memberikan hasil LC50 berkisar antara 0,1615 ó 11,8351 g/ml. Pengujian dengan sel Leukemia L1210. Dari hasil pengujian ekstrak, diketahui IC50nya sangat rendah yaitu <10 g/ml (4,99 ó 7,71 g/ml), dengan batas IC50 suatu ekstrak tanaman untuk dapat dinyatakan berpotensi sebagai suatu antikanker adalah 10 g/ml², Sumastuti membuktikan bahwa Mahkotadewa menghambat pertumbuhan sel hela (sel kanker rahim)³.

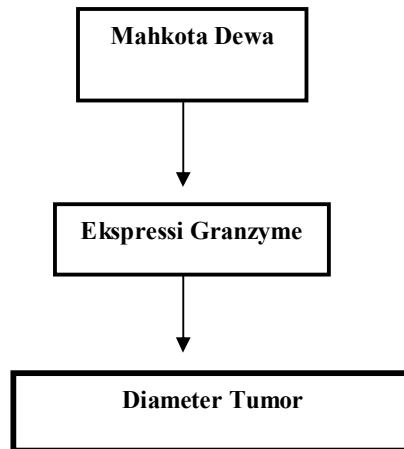
Pada penelitian yang dilakukan Tazulakhova dari Gamaleya Institute of Microbiology and Epidemiology, Moscow ó Rusia dan Chittaranjan National Cancer Institute, Kolkata - India mengemukakan bahwa *polyphenol* alamiah dapat menstimulasi produksi Interferon- (IFN-) dan Interleukin-2 (IL-2) dalam suatu populasi immunosit yang kemudian akan memacu aktivasi CTL dan sel NK pada sistem perondaan imun terhadap sel-sel kanker^{5,6} Penelitian lain yang dilakukan oleh Selamat B dkk pada adenokarsinoma mamma mencit C3H membuktikan bahwa pemberian dosis bertingkat *Phaleria makrocarpa* akan meningkatkan skor ekspresi *perforin* CTL dan sel-NK serta meningkatkan indeks apoptosis sel-sel tumor secara signifikan.³⁰

2.6. Kerangka teori



Gambar-5. kerangka teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar-6. kerangka konsep

2.8. Hipotesis Penelitian

Hipotesis Mayor

Pemberian dosis bertingkat ekstrak Mahkotadewa, sitostatika, dan kombinasi Mahkota dewa dengan sitostatika efektif terhadap peningkatan ekspresi *granzyme* sel mononuklear dan dapat menghambat perkembangan diameter tumor karsinoma epidermoid pada mencit Swiss.

Hipotesis Minor

2.8.1 Terdapat perbedaan peningkatan ekspresi *granzyme* sel mononuklear kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa, sitostatika, dan kombinasi Mahkota dewa dengan sitostatika.

- 2.8.2 Terdapat perbedaan hambatan perkembangan diameter tumor karsinoma epidermoid kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa, sitostatika, dan kombinasi Mahkota dewa dengan sitostatika.
- 2.8.3 Terdapat pengaruh antara ekspresi *granzyme* sel mononuklear dengan perkembangan diameter tumor karsinoma epidermoid kelompok mencit yang diberi dosis bertingkat Mahkotadewa, sitostatika, dan kombinasi Mahkota dewa dengan sitostatika.