

KARYA AKHIR

**HUBUNGAN EKSPRESI PROTEIN E7 PADA LESI
SKUAMOUS INTRAEPITHELIAL SERVIKS DAN
KARSINOMA SEL SKUAMOSA SERVIKS TERHADAP
EKSPRESI PD-L1 DAN RESPON INFILTRASI LIMFOSIT**

***RELATIONSHIP E7 PROTEIN EXPRESSION IN CERVIC
INTRAEPITHELIAL SQUAMOUS LESION AND CERVIC
SQUAMOUS CELL CARCINOMA TO PD-L1 EXPRESSION AND
LYMPHOCYTE INFILTRATION***

RIADI



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
ILMU PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
2021**

**HUBUNGAN EKSPRESI PROTEIN E7 PADA LESI
SKUAMOUS INTRAEPITHELIAL SERVIKS DAN
KARSINOMA SEL SKUAMOSA SERVIKS TERHADAP
EKSPRESI PD-L1 DAN RESPON INFILTRASI LIMFOSIT**

Karya Akhir

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Dokter Spesialis-1

Program Studi Ilmu Patologi Anatomi

Disusun dan diajukan oleh:

RIADI

Kepada

**KONSENTRASI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS-1
DEPARTEMEN PATOLOGI ANATOMI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

KARYA AKHIR

HUBUNGAN EKSPRESI PROTEIN E7 PADA LESI SKUAMOUS INTRAEPITHELIAL SERVIKS DAN KARSINOMA SEL SKUAMOSA SERVIKS TERHADAP EKSPRESI PD-L1 DAN RESPON INFILTRASI LIMFOSIT

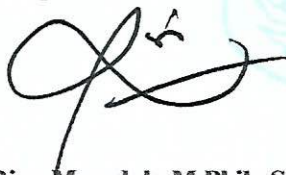
Disusun dan diajukan oleh :

dr. Riadi
C075181001

Telah dipertahankan di hadapan Panitia ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Pendidikan Dokter Spesialis
Program Studi Ilmu Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin pada tanggal 08 November 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama



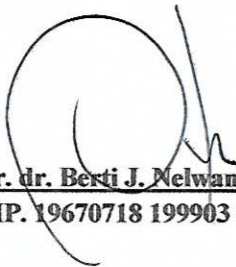
Dr. dr. Rina Masadah, M.Phil., Sp.PA(K)
NIP. 19670429 199202 2 002

Pembimbing Pendamping



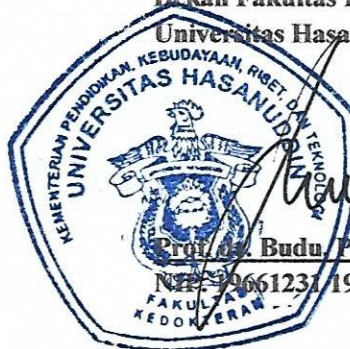
Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)
NIP. 19670718 199903 1 002

**Ketua Program Studi
Ilmu Patologi Anatomi**



Dr. dr. Berti J. Nelwan, M.Kes, Sp.PA(K)
NIP. 19670718 199903 1 002

**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin**



Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661231 199503 1 009

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riadi
NIM : C075181001
Program Studi : Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi
Anatomi Universitas Hasanuddin

Menyatakan dengan sebenarnya, bahwa karya akhir yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 13 Desember 2021

Yang menyatakan,



Riadi

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala nikmatNya sehingga karya akhir ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulisan karya akhir ini merupakan salah satu syarat penyelesaian studi dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Patologi Anatomi pada Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Karya akhir penelitian ini penulis ajukan dengan harapan dapat menjadi dasar landasan berbasis bukti dalam pengembangan terapi target PD-L1 dalam manajemen lesi skuamous intraepithelial (SIL) dan karsinoma sel skuamous serviks (KSS). Dalam lingkup yang lebih luas penulis berharap karya ini dapat menjadi referensi bagi para ilmuwan dan bagi para patolog mengenai peranan E7 dan PD-L1 sebagai marker prediktif dan prognostik pada SIL dan KSS.

Penulis berterima kasih dan menghaturkan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam proses penyusunan dan penelitian hingga perampungan karya akhir ini, antara lain:

1. Dr.dr.Rina Masadah, M.Phil,Sp.PA(K) sebagai pembimbing utama atas segala bentuk dukungan dan perhatian, bimbingan serta arahan sehingga karya akhir ini dapat selesai dengan baik.
2. Dr.dr. Berti J. Nelwan, M.Kes,Sp.PA(K) sebagai pembimbing anggota atas bimbingan dan arahan selama proses penelitian dan penyusunan karya akhir ini.
3. Dr.dr. Andi Alfian Zainuddin, MKM sebagai pembimbing metode penelitian dan statistik, atas bimbingan terhadap analisa statistik penelitian yang dikerjakan hingga mencapai pembuktian hipotesis dan tujuan penelitian yang diharapkan.
4. Prof. dr. Syarifuddin Wahid, Ph.D,Sp.PA(K) dan dr. Upik A. Miskad, Ph.D, Sp.PA(K) atas pertanyaan dan masukan perbaikan yang membangun kerangka dan pembahasan penelitian ini ke arah yang lebih baik dan komprehensif.
5. Seluruh staf pengajar dan staf kependidikan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin atas segala bimbingan dan perhatian hingga selesainya karya akhir ini.
6. Rektor Universitas Hasanuddin dan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin sebagai pimpinan institusi bagi penulis dalam menempuh Program Pendidikan Dokter Spesialis Patologi Anatomi.
7. Manajer Program Pendidikan Dokter Spesialis Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang senantiasa memantau dan membantu proses dan kelancaran pendidikan penulis.
8. Seluruh teman sejawat residen Patologi Anatomi, seluruh rekan sejawat teknisi dan staf di RSPTN Universitas Hasanuddin, RSUP Wahidin Sudirohusodo, dan Sentra Diagnostik Patologia Makassar.
9. Orang tua penulis, Darbani dan Memer Surjanti, dan seluruh keluarga besar yang selalu mendoakan dan memberi perhatian selama proses pendidikan penulis.

10. Seluruh pihak yang telah membantu penulis.

Kiranya karya akhir ini dapat menjadi sumbangan bagi khazanah ilmu pengetahuan dan menjadi amal jariah bagi penulis di kemudian hari.

Makassar, 13 Desember 2021

Riadi

ABSTRAK

Riadi, Rina Masadah, Berti J. Nelwan, Andi Alfian Zainuddin, Upik A. Miskad, Syarifuddin Wahid. Hubungan ekspresi protein E7 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks terhadap ekspresi PD-L1 dan respon infiltrasi limfosit

Tujuan Penelitian: Menentukan hubungan ekspresi protein E7 terhadap PD-L1 dan TILs pada lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks.

Metode Penelitian: Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan retrospektif menggunakan sampel arsip blok paraffin yang didiagnosis sebagai lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi anti-PD-L1 dan Protein E7. Analisis profil ekspresi dilakukan dengan mikroskop cahaya Olympus CX-43 sehingga didapatkan data intensitas dan persentase ekspresi sel. Dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin dan dilakukan penilaian menggunakan mikroskop cahaya Olympus CX-43 sehingga didapatkan persentase dan kepadatan infiltrasi limfosit. Data dianalisis secara statistik dengan uji One-Way Anova, Fisher exact test, dan Chi-Square serta disajikan dengan dalam tabel dan grafik menggunakan software SPSS 18.

Hasil Penelitian: Penelitian ini menggunakan 45 sampel yang terdiri dari 13(28,9%) LSIL, 15(33,3%) HSIL dan 17 (37,8%) KSS. Usia rata-rata sampel SIL lebih tinggi daripada KSS ($p < 0,001$). Tidak terdapat hubungan yang bermakna antara diagnosa dan ekspresi protein E7 ($p = 0,383$). Sampel yang mengekspresikan protein E7 memiliki ekspresi PD-L1 yang lebih tinggi ($p = 0,002$). Terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi PD-L1 dengan persentase TILs ($p < 0,001$) dan kepadatan TILs ($p < 0,001$).

Kesimpulan dan Saran: Pada penelitian ini menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara protein E7 pada SIL dan KSS serta berhubungan dengan peningkatan ekspresi PD-L1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk menganalisis patomekanisme hubungan antara protein E7 dan PD-L1. Ekspresi PD-L1 berhubungan dengan derajat TILs. Penggunaan PD-L1 dapat digunakan dalam imunoterapi lesi SIL dan KSS.

Kata Kunci : Lesi skuamous intraepithelial; karsinoma sel skuamosa; PD-L1; Protein E7; TILs

ABSTRACT

Riadi, Rina Masadah, Berti J. Nelwan, Andi Alfian Zainuddin, Upik A. Miskad, Syarifuddin Wahid. Hubungan ekspresi protein E7 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks terhadap ekspresi PD-L1 dan respon infiltrasi limfosit.

Objective: To determine relationship between E7 protein to PDL-1 and TILs in squamous intraepithelial lesion and squamous cell carcinoma

Methods: This study was an observational study with a retrospective approach using paraffin block archival samples diagnosed as squamous intraepithelial lesion and squamous cell carcinoma. Immunohistochemical staining using anti-PD-L1 antibody and E7 Protein. Expression profile analysis were performed with an Olympus CX-43 light microscope to obtain intensity and percentage expression profiles. Hematoxylin-eosin stain used to examined lymphocyte percentage and density. Data were statistically analyzed by One way Annova, Fisher Exact Test, and Chi-Square and presented intables and graphs using SPSS 18.

Results: This study used 45 samples consisting of 13 (28.9%) LSIL, 15 (33.3%) HSIL and 17 (37.8%) SCC. The mean age of the SIL was higher than SCC ($p < 0.001$). There was no significant relationship between diagnosis and expression of E7 protein ($p = 0.383$). Samples expressing E7 protein had higher PD-L1 expression ($p = 0.002$). There was significant relationship between the expression of PD-L1 with the percentage of TILs ($p < 0.001$) and the density of TILs ($p < 0.001$).

Conclusions: In this study, there was a significant difference between the E7 protein in SIL and SCC and was associated with an increase in PD-L1 expression. Further research is needed to analyze the pathomechanism of the relationship between the E7 protein and PD-L1. PD-L1 expression correlated with the degree of TILs. The use of PD-L1 can be used in immunotherapy of SIL and SCC lesions.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
HALAMAN PENGESAHAN	II
PERNYATAAN KEASLIAN KARYA AKHIR	IV
PRAKATA	V
ABSTRAK	VII
ABSTRACT	VIII
DAFTAR ISI	IX
DAFTAR SINGKATAN	XI
DAFTAR TABEL DAN GRAFIK	XII
DAFTAR GAMBAR.....	XIII
BAB I	1
1.1. RUMUSAN MASALAH	3
1.2. TUJUAN PENELITIAN	4
1.2.1. Tujuan Umum	4
1.2.2. Tujuan Khusus	4
1.3. HIPOTESIS	5
1.4. MANFAAT PENELITIAN	5
BAB II	6
2.1. ANATOMI DAN HISTOLOGI	6
2.2. PERUBAHAN KEGANASAN PADA SERVIKS	8
2.2.1. Etiologi	8
2.2.2. Karsinogenesis	8
2.2.3. Grading Lesi Prekanker Serviks	12
2.2.4. Staging Kanker Serviks	14
2.3. ASPEK IMUNOLOGI KEGANASAN SERVIKS	16
2.3.1. Antigen tumor	16
2.3.2. Respon imun terhadap tumor	17
2.3.3. PDL1, regulasi, signaling	19
2.4. PERANANAN MICRO RNA TERHADAP EKSPRESI PD-L1	23
2.4.1. MicroRNA	23
2.4.2. Hubungan antara micro RNA dan PD-L1	25
2.4.3. Micro RNA pada HPV	27
2.5. PENANGANAN KANKER SERVIKS	28
2.5.1. Prinsip terapi bedah	28
2.5.2. Prinsip radioterapi	29
2.6. KERANGKA TEORI	31
BAB III	32
3.1. IDENTIFIKASI VARIABEL	32
3.2. KLASIFIKASI VARIABEL	32
3.3. KERANGKA KONSEP	33
BAB IV	34
4.1. DESAIN PENELITIAN	34

4.2. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	34
4.3. POPULASI PENELITIAN.....	34
4.4. SAMPEL DAN CARA PENGAMBILAN SAMPEL	34
4.5. PERKIRAAN BESAR SAMPEL	34
4.6. KRITERIA INKLUSI DAN EKSKLUSI	35
4.6.1. <i>Kriteria Inklusi</i>	35
4.6.2. <i>Kriteria Eksklusi</i>	35
4.7. CARA KERJA.....	35
4.7.1. <i>Alokasi Subyek</i>	35
4.7.2. <i>Prosedur Pewarnaan Hematoxylin-Eosin</i>	36
4.7.3. <i>Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia</i>	37
4.7.4. <i>Interpretasi Hasil Pewarnaan Imunohistokimia</i>	37
4.7.5. <i>Metode Skoring Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>	38
4.8. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN KLASIFIKASI VARIABEL.....	41
4.8.1. <i>Definisi Operasional</i>	41
4.8.2. <i>Kriteria Objektif</i>	42
4.9. PENOLAHAN DAN ANALISIS DATA.....	43
4.10. ALUR PENELITIAN	44
BAB V	45
5.1. HASIL PENELITIAN.....	45
5.1.1. <i>Jumlah Sampel</i>	45
5.1.2. <i>Karakteristik sampel</i>	49
5.1.3. <i>Karakteristik diagnosis berdasarkan usia</i>	50
5.1.4. <i>Hubungan ekspresi protein E7 dengan lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks</i>	51
5.1.5. <i>Hubungan ekspresi protein E7 dengan ekspresi PD-L1</i>	52
5.1.6. <i>Hubungan ekspresi PD-L1 dengan persentase TILs</i>	54
5.1.7. <i>Hubungan PD-L1 dengan kepadatan limfosit</i>	55
5.1.8. <i>Hubungan PD-L1 Dengan Gambaran Histopatologi</i>	57
5.2. PEMBAHASAN PENELITIAN.....	59
5.2.1. <i>Karakteristik sampel</i>	59
5.2.2. <i>Hubungan protein E7 dengan lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks</i>	60
5.2.3. <i>Hubungan ekspresi protein E7 dengan ekspresi PD-L1</i>	61
5.2.4. <i>Hubungan ekspresi PD-L1 dengan TILs</i>	63
5.2.5. <i>Pengunaan terapi anti PD-L1</i>	65
BAB IV	67
6.1. KESIMPULAN.....	67
6.2. SARAN.....	67
DAFTAR PUSTAKA	69

DAFTAR SINGKATAN

DNA	Deoxyribonucleic Acid
HPV	Human Papilloma Virus
miRNA	micro Ribonucleic Acid
TILs	T Cell Infiltrating Lymphocytes
CD8	Cluster of Differentiation 8
PD-L1	Program Death - Ligan 1
SHP	Small Heterodimer Partner
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
SIL	Squamous intraepithelial lesion / lesi intraepithelial skuamous
KSS	Karsinoma sel skuamous
SCJ	Squamocolumnar junction
RB	Retinoblastoma
CDK	Cyclin-Dependent Kinases
BAX	Bcl-2-associated X protein
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
HIF1Alfa	Hypoxia Inducible Factor 1 Alafa
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MYC	Major Histocompatibility Complex
NK	Neutral Killer
Ig	Immunoglobulin
INF	Interferon
LPS	Lipopolisakarida
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
mTOR	Mammalian target of rapamycin
LMP1	Latent membran protein 1
JAK	Janus kinase
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
EBRT	<i>external beam radiotherapy</i>

DAFTAR TABEL DAN GRAFIK

Tabel 1.	MiRNA yang mengalami perubahan pada infeksi HPV	38
Tabel 2.	Karakteristik umum sampel	62
Tabel 3.	Hubungan antara usia dengan diagnosa sampel	64
Grafik 1.	Hubungan antara usia dengan diagnosa sampel	64
Tabel 4.	Uji one way annova antara usia dengan diagnosa sampel	64
Tabel 5.	Hubungan antara protein E7 dengan diagnosa	65
Tabel 6.	Hubungan antara ekspresi PD-L1 dengan protein E7	66
Tabel 7.	Hubungan antara protein E7 dengan intensitas PD-L1	67
Tabel 8.	Hubungan antara protein E7 dengan persentase PD-L1	68
Tabel 9.	Hubungan antara persentase TILs dengan ekspresi PD-L1	69
Tabel 10.	Hubungan ekspresi PD-L1 dengan kepadatan TILs	70
Grafik 2.	Perbandingan antara kepadatan TILs dengan ekspresi PD-L1	71
Tabel 11.	Hasil uji Post Hoc hubungan ekspresi PD-L1 dengan Kepadatan TILs	72
Tabel 12.	Hubungan antara PD-L1 dengan gambaran histopatologi	73

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Anatomi Serviks	11
Gambar 2.	Histologi normal serviks	12
Gambar 3.	Gambar histologi squamocolumnar junction	13
Gambar 4.	Antigen pada sel tumor	24
Gambar 5.	Mekanisme resistensi sel tumor terhadap sistem pertahanan tubuh	27
Gambar 6.	Signaling pathway dan microRNA yang berperan	35
Gambar 7.	Langkah-langkah dalam menghitung presentase stromal yang diinfiltrasi oleh limfosit	50
Gambar 8.	Contoh pelaporan persentase jumlah stromal yang diinfiltrasi oleh limfosit	51
Gambar 9.	Kepadatan infiltrasi limfosit pada pewarnaan Hematoxilin-Eosin	58
Gambar 10.	Intensitas pewarnaan PD-L1	60
Gambar 11.	Intensitas pewarnaan Protein E7	61

BAB I

LATAR BELAKANG MASALAH

Di seluruh dunia, kanker serviks merupakan kanker ke empat tersering yaitu sebanyak 7,9% dari seluruh kanker yang dialami oleh wanita, dimana sekitar 85% kejadian kanker serviks terjadi pada negara berkembang. Tingkat kematian akibat kanker serviks sebesar 7,5% dari seluruh kematian yang diakibatkan oleh keganasan. Di Indonesia sendiri, sebesar 1,4% penduduk mengalami kejadian kanker. Kejadian kanker meningkat 11,02 % dan jumlah angka kematian meningkat 7,89 % dari tahun 2008-2012. Riset Kesehatan Dasar Indonesia mengungkapkan, pada tahun 2013 jumlah kasus kanker serviks di Indonesia meningkat menjadi 98.692 dengan prevalensi sebesar 0,8% diikuti dengan kanker payudara sebesar 0,5%. Di Makassar, berdasarkan data dari Rumah Sakit Pendidikan Dr.Wahidin Sudirohusodo (RSWS) pada tahun 2019 tercatat 43 kasus baru keganasan skuamous serviks.

Penyebab utama dari lesi pada serviks hampir selalu dikaitkan dengan adanya Human Papilloma Virus (HPV), pada lesi low grade serviks prevalensi ditemukannya HPV antara 29,2-100%, dan pada lesi high grade lesi yang ditemukan 77,2-100%.(Shah et al., 2018) Dari seluruh lesi pada serviks didapatkan 50% lesi mengandung DNA HPV 16 dan 14% mengandung DNA HPV 18.(Bosch et al., 1995) Kedua virus ini menghasilkan onkogen berupa protein E6 dan E7 yang bertanggung jawab dalam proses karsinogenesis terutama dalam proses transformasi sel dan siklus mitosis.(Syrjänen & Syrjänen, 1999) Dengan adanya vaksinasi untuk HPV terbukti telah menurunkan prevalensi infeksi HPV dan menurunkan lesii ganas pada serviks, vulva, dan vagina.(Lee & Garland, 2017; Munoz et al., 2010; Patel et al., 2018) Vaksinasi lebih menekankan pada upaya preventiv, sehingga perlu adanya upaya

terapeutik pada pasien yang sudah menderita lesi pada serviks yang diakibatkan oleh infeksi HPV.

Pada penelitian penelitian yang dilakukan oleh Wang et al dan Yuqing He et al, ditemukan bahwa infeksi HPV 16 dan 18 dapat mempengaruhi ekspresi microRNA(miRNA). Sekitar 42 jenis miRNA terregulasi oleh infeksi HPV 16 dan 18 pada sel host.(Y. He, Lin, Ding, Liu, Luo, Huang, Xu, Kim, Etheridge, & Lin, 2016; X. Wang et al., 2014) Delapan dari miRNA tersebut tersebut berhubungan langsung dengan adanya ekspresi protein E7 yang dihasilkan oleh HPV 16 dan 18.(P. Dong et al., 2018; X. Wang et al., 2014)

Mekanisme sistem pertahanan tubuh terhadap sel kanker perlu menjadi perhatian khusus, dimana sel imunitas tubuh memainkan peranan penting dalam proses angiogenesis (Albini et al., 2018), prometastasis (Blomberg et al., 2018), dan infiltrasi limfosit pada sel kanker. Limfosit yang ditemukan langsung pada area tumor disebut tumor infiltrating lymphocytes (TILs). TILs dianggap sebagai gambaran respon imun primer pejamu melawan tumor. Salah satu subpopulasi dari TILs yang memegang peran penting dalam imunitas terhadap tumor adalah sel T sitotoksik CD8+ yang merupakan bentuk respon imun adaptif.(Abbas et al., 2018). Salah satu yang mempengaruhi respon imun adalah protein PD-L1 yang berperan sebagai immunosupresan. Protein ini diregulasi oleh 3 jalur yaitu Stat1, PI3k-AKT, dan SHP2.(J. Chen et al., 2016; Y. Dong et al., 2017) Beberapa miRNA yang terregulasi akibat infeksi HPV terlibat dalam dua dari tiga jalur tersebut seperti miRNA-18a(P. Dong et al., 2018), miRNA92a, miRNA-100 dan miRNA-27a.(X. Wang et al., 2014)

Anti PD-L1 sendiri sudah digunakan untuk imunoterapi pada keganasan squamous cell carcinoma head and neck, keganasan colorectal, dan paru.(Lin et al.,

2018; Santini & Hellmann, 2018; Yaghoubi et al., 2019) Untuk keganasan pada serviks, penelitian yang telah dilakukan sebelumnya memperlihatkan bahwa protein E7 yang dihasilkan HPV 16 dan 18 menurunkan respon CD8+ untuk melawan berespon terhadap keganasan serviks.(C. Liu et al., 2017; Mezache et al., 2015; Santin et al., 2003) yang diakibatkan oleh meningkatkan intensitas PD-L1 pada lesi premalignant dari kanker serviks.(Yang et al., 2013) Pada penelitian lainnya didapatkan hasil yang sedikit berbeda dimana infeksi HPV tidak berhubungan langsung dengan peningkatan PD-L1. Hanya infeksi HPV yang menyebabkan lesi pada serviks yang meningkatkan ekspresi PD-L1.(Yang-Chun et al., 2017) Selain itu pada hewan coba telah menunjukkan bahwa penggunaan imunoterapi anti PD-L1 pada keganasan serviks dapat mengurangi ukuran karsinoma serviks maupun pada lesi prakanker.(Rice et al., 2015; Yang-Chun et al., 2017)

Penelitian ini merupakan pertama dilakukan dengan mengambil sampel penderita lesi serviks di Makassar. Penelitian ini penting dilakukan untuk melihat hubungan antara ekspresi PD-L1, protein E7, dan derajat TILs pada lesi serviks dan karsinoma sel skuamous serviks karena masih terdapat perbedaan hasil penelitian tentang hubungan infeksi HPV dan ekspresi PD-L1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai faktor prognostik dan imunoterapi.

1.1. Rumusan masalah

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah diatas dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut.

1. Apakah terdapat perbedaan ekspresi protein E7 pada lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks?
2. Apakah terdapat perbedaan ekspresi PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks?

3. Apakah terdapat hubungan antara protein E7 dan PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial dan sel skuamosa serviks?
4. Apakah terdapat perbedaan derajat TILs dengan ekspresi PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks?

1.2. Tujuan Penelitian

1.2.1. Tujuan Umum

Menentukan hubungan ekspresi protein E7 terhadap PD-L1 dan TILs pada lesi skuamous intraepithelial dan karsinoma sel skuamosa serviks.

1.2.2. Tujuan Khusus

1. Menentukan ekspresi PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
2. Menentukan ekspresi protein E7 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
3. Menentukan persentase luas area TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
4. Menentukan kepadatan limfosit pada area TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
5. Membandingkan ekspresi protein E7 dengan lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
6. Membandingkan ekspresi protein E7 dengan PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
7. Membandingkan ekspresi PD-L1 sel tumor dengan persentase luas area TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.

8. Membandingkan ekspresi PD-L1 sel tumor dengan kepadatan TILs pada area TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.

1.3. Hipotesis

1. Terdapat hubungan antara ekspresi protein E7 dengan ekspresi PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
2. Terdapat hubungan antara ekspresi PD-L1 dengan persentase luas area TILs pada karsinoma sel skuamosa serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.
3. Terdapat hubungan antara ekspresi PD-L1 dengan kepadatan limfosit pada area TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamosa serviks.

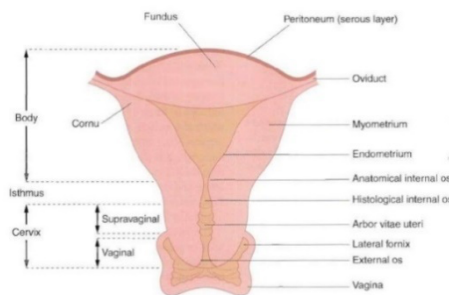
1.4. Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang konsep biologis hubungan protein E7 dengan PD-L1 pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamous serviks.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang konsep biologis hubungan PD-L1 dengan derajat TILs pada lesi skuamous intraepithelial serviks dan karsinoma sel skuamous serviks.
3. Data penelitian ini dapat digunakan untuk kepentingan imunoterapi.
4. Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut dalam aspek imunologi pada kanker serviks.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anatomi dan Histologi

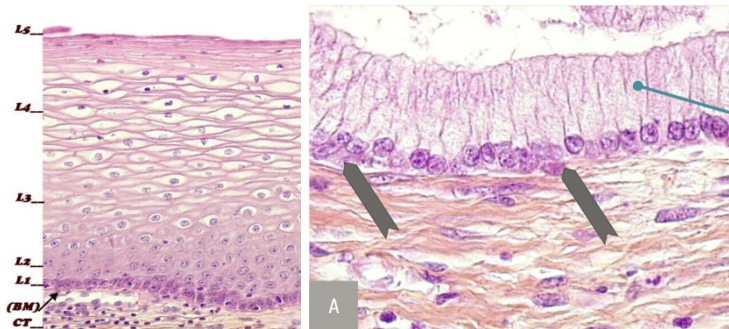
Serviks merupakan bagian terendah dari uterus yang terdiri dari bagian supravaginal dan bagian vaginal. Apabila dilihat dari vagina akan tampak porsi dengan diameter 2 cm dan panjang 2-2,5 cm. Ukuran ini akan meningkat pada saat masa postmenopause ataupun kejadian prolapse. Organ fibromuskular ini memiliki batas superior berupa uterus dan batas inferior berupa vagina.



Gambar 1. Anatomi serviks

Pada porsi dapat ditemukan dua terlihat bagian dari endoserviks dan ektoserviks. Kedua bagian ini akan dipisahkan oleh squamocolumnar junction (SCJ). Pada bagian tengah dari porsi dapat ditemukan ostium eksterna. Ostium ini akan berbentuk kecil dan sirkular pada nulipara. Pada multipara, ostium akan tampak menggebung dan berbebetuk seperti celah pipih. Selain ostium eksterna, terdapat juga ostium interna di bagian atas dari serviks yang membatasi serviks dengan uterus. Serviks tersusun atas lapisan mukosa, otot polos yang tebal, dan pada bagian belakang terdapat jaringan ikat yang terhubung dengan peritoneum.

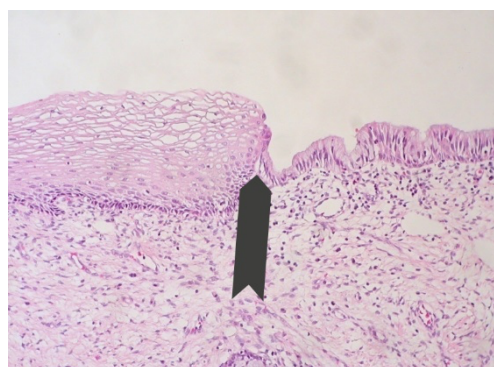
Ektoserviks dilapisi oleh epitel skuamosa bertingkat tanpa keratin. Epitel skuamosa dari serviks terdiri dari beberapa lapis, yaitu basal, parabasal, dan superfisial. Endoserviks dilapisi oleh epitel kolumnar selapis yang mensekresikan mukus.



Gambar 2. Histologi normal ektoserviks (kiri) dan endoserviks (kanan).

Keterangan CT=jaringan ikat; BM=membran basal; L1=sel basal (1 lapis); L2= sel parabasal (2 lapis); L3= sel intermediate (+8 lapis); L4= superfisial (5-6 lapis); L5= sel tereksfoliasi

Squamocolumnar junction merupakan hasil remodeling secara terus menerus dari sel-sel yang terdapat pada endoserviks dan ektoserviks. Letak dari SCJ ini secara umum dipengaruhi oleh usia dan hormonal. Pada saat kelahiran hingga akhir masa premenarche, SCJ berada sangat dekat dengan ostium eksterna. Pada saat masa reproduksi, SCJ baru akan terlihat dengan jarak yang bervariasi dari ostium eksternal. Pada masa postmenopause, SCJ baru akan tidak terlihat karena sudah teresesasi ke dalam endoserviks.



Gambar 3. Gambaran histologi Skuamocolumnar junction

Area antara SCJ asli dengan SCJ baru disebut dengan zona transformasi.

Zona ini terbentuk dari proses metaplasia skuamosa. Metaplasia terjadi pada endoserviks yang mengalami proliferasi. Awal dari proliferasi akan bersifat imatur yang ditandai dengan adanya sel endoservikal pada bagian atas. Apabila sudah bersifat matur, gambaran sel akan serupa dengan ektoserviks.

2.2. Perubahan keganasan pada serviks

2.2.1. Etiologi

Secara umum keganasan pada manusia dipengaruhi oleh karsinogen. Karsinogen adalah zat yang menyebabkan kerusakan genetik, secara umum dibagi menjadi tiga jenis karsinogen yaitu kimia, radiasi, dan produk dari mikroba. (Kumar et al., 2017b) Pada keganasan dari serviks biasanya disebabkan oleh agen mikroba dalam hal ini Human Papiloma Virus. HPV merupakan virus DNA dengan klasifikasi Familia : Papovaviridae, Genus : Papillomavirus, Spesies : Human Papillomavirus. Virus ini merupakan virus kecil (diameter 45-55 nm) yang mempunyai genom beruntaiganda yang sirkuler diliputi oleh kapsid (kapsid ini berperan pada tempat infeksi pada sel) yang tidak berpembungkus menunjukkan bentuk simetri ikosahedral. (Z. Chen et al., 2018) Sebagai contoh, tipe 1,2,4, dan 7 menyebabkan benign squamous papilomas. Sedangkan tipe 16 dan 18 menyebabkan kanker yaitu squamous cell carcinoma pada serviks dan anogenital. (Z. Chen et al., 2018; Habbous et al., 2014; Kumar et al., 2017b)

2.2.2. Karsinogenesis

Seperti yang telah disebutkan diatas, sebagian besar perubahan keganasan yang terjadi pada serviks disebabkan oleh Human Papiloma Virus (HPV). Sebagian

besar infeksi HPV tidak menunjukkan gejala klinis dan akan hilang dalam beberapa bulan oleh respon imun tubuh. Apabila tidak dapat dieliminasi beberapa kali menunjukkan perubahan Menjadi Squamous Intraepithelial Lesion (SIL) yang merupakan tanda awal terjadinya keganasan pada serviks. Infeksi HPV ini hampir selalu ditemukan pada keganasan dari serviks dan sangat berhubungan dengan usia pertama kali berhubungan, berhubungan dengan berganti-ganti pasangan, dan hubungan sesama jenis. (Kumar et al., 2017a)

Seperti virus DNA lain, HPV menggunakan polimerasi dari host untuk berreplikasi. Untuk berreplikasi inilah virus memiliki dua protein yaitu E6 dan E7 yang merupakan oncoprotein. Seperti yang telah diketahui bahwa salah satu tumor supresor yang ada dalam sel yaitu protein RB. Protein RB berfungsi untuk mengatur checkpoint G1/S, dimana setiap sel harus melewati regulator ini sebelum melanjutkan proses replikasi DNA. Mekanisme kerja dari protein ini erat kaitannya dengan protein E2F yang menentukan terjadi atau tidaknya proses transkripsi. Apabila terdapat sinyal inhibisi maka akan mengaktifkan CDK Inhibitor (p16) dan menghentikan aktifitas Cyclins D/CDK4,6 dan cyclin E/CDK2, ketidak adaan kedua protein tersebut menyebabkan tidak terfosforilasinya protein RB dan mengikat protein E2F. terikatnya protein E2F menyebabkan berhentinya siklus sel pada G1. Begitu pula sebaliknya apabila protein RB terfosforilasi maka ikatan RB dengan E2F akan terlepas, dan E2F akan memicu proses transkripsi. Pada beberapa jenis keganasan ditemukan gen dari protein RB normal, tetapi terjadi fosforilasi berlebihan ini. Khusus pada keganasan yang disebabkan oleh virus HPV, protein E7 inilah yang berikatan dengan RB yang tidak terfosforilasi sehingga tidak dapat mencegah transkripsi faktor E2F. adanya transkripsi faktor E2F ini lah yang menyebabkan terlewatnya checkpoint G1/S dan menyebabkan proliferasi yang berlebihan dan memicu timbulnya keganasan.

Secara terpisah protein E7 ini juga menyebabkan berkurangnya ekspresi P21 yang merupakan CDK inhibitor, dan menyebabkan bebasnya fosforilasi pada RB.(Jhingran et al., 2020; Kumar et al., 2017b)

Gen supresor tumor yang lain adalah P53 atau lebih sering disebut dengan Guardian of Genome. Fungsi dari protein P53 antara lain memidiasi sel untuk dalam siklus istirahat apabila ditemukan adanya kerusakan pada DNA. Siklus istirahat ini berada pada G1, dengan cara menghambat kompleks CDK dan menghambat terjadinya fosforilasi pada protein RB. Selain itu fungsi lain dari p53 yaitu menghentikan proses ekspresi gen secara permanen pada saat tertentu. Hal ini menyebabkan terjadinya penuaan pada sel. Dan fungsi ketiga yaitu menyebabkan Apoptosis yang diperantarai oleh protein BAX. Dengan beberapa fungsi utama diatas, dapat menjelaskan bahwa P53 merupakan suatu protein yang berfungsi untuk mencegah terjadinya pembelahan apabila terjadi mutasi pada genom. Hal ini dibuktikan bahwa dalam 70% keganasan pada manusia terdapat defek pada P53. Pada defek ini menyebabkan terbentuknya sel mutan yang bereplikasi terus menerus yang sering dikenal dengan sel kanker. P53 akan dihambat kerjanya oleh protein E6 dari HPV yang menyebabkan supresor tumor tersebut fungsinya akan terhambat. Protein E6 ini juga akan menstimulasi dari TERT, sebuah subunit katalisis dari telomerasi yang akan menyebabkan sel tersebut tidak akan mati. Protein E6 dari high risk HPV memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap P53 dibandingkan dari tipe HPV low-risk, inilah yang menyebabkan onkogenesis.(Hoppe-Seyler et al., 2018; Kumar et al., 2017b)

Kehilangan kontrol terhadap siklus sel merupakan suatu penyebab utama transformasi menjadi keganasan yang terjadi. Kontrol utama yang pada sel kanker antara lain yaitu (p16, cyclin D, CDK4, RB). Oleh karena itu melihat perubahan-

perubahan yang terjadi pada sel kanker serviks dimana terjadi penurunan kemampuan tubuh dalam mengontrol mutasi sehingga, sangat memungkinkan tubuh akan mengalami mutasi yang tidak terkontrol.(Z. Chen et al., 2018; Hoppe-Seyler et al., 2018)

Dengan meningkatnya siklus sel, maka akan menyebabkan kebutuhan oksigen yang lebih besar dibanding sel normal. Kebutuhan oksigen inilah yang menyebabkan peningkatan kebutuhan nutrisi dan oksigen yang meningkat. Pada kondisi ini maka sel akan melakukan proses autophagy. Autophagy adalah suatu kondisi dimana terjadi kekurangan nutrisi yang hebat bukan hanya berhentinya pertumbuhan tetapi mengkanibalisasi organelnya sendiri sebagai sumber protein. Kondisi inilah yang menyebabkan berkurangnya jumlah organela dan sitoplasma didalam sel. Selain kekurangan nutrisi sel kanker juga memerlukan jumlah oksigen lebih banyak sehingga sel akan merubah proses metabolisme dengan meningkatkan konversi glukosa menjadi laktosa dengan glycolityc pathway.(Jhingran et al., 2020; Kumar et al., 2017b)

Seperti yang telah disebutkan diatas, bahwa sel tumor juga memerlukan oksigen dan nutrisi dan membuang produk sisa, ketiga hal ini hanya dapat terjadi apabila sel tumor mendapat akses terhadap pembuluh darah. Oleh karena itu pertumbuhan kanker akan menstimulasi neoangiogenesis dari kapiler yang ada sebelumnya. angiogenesis dipengaruhi oleh keseimbangan antara stimulan dan supresan antara lain : kekurangan oksigen yang menyebabkan HIF1alfa yang mengakibatkan terbentuknya VEGF, kehilangan kemampuan p53 menyebabkan berkurangnya trombospodin-1 yang bersifat menghambat angiogenesis dan juga meningkatkan VEGF. VEGF juga dipengaruhi oleh sinyal dari jalur RSP-MAP kinase yang biasanya terganggu dalam sel kanker. Apabila terbentuk pembuluh darah baru dapat menyebabkan berkurangnya proses autofagy karena kebutuhan oksigen dan

nutrien dapat disokong oleh pembuluh darah baru tersebut.(Jhingran et al., 2020; Kumar et al., 2017b)

Virulensi dari HPV merupakan faktor yang sangat penting dalam perkembangan SIL menjadi sebuah keganasan. Tipe 16 dan 16 merupakan penyebab utama, sekitar 70%, dari keganasan serviks. Selain itu tipe ini juga dapat menyebabkan integrasi DNA virus kedalam genom manusia yang berhubungan dengan progresifitas penyakit. Dimana intergrasi sering terjadi pada MYC yang menyebabkan overexpresi yang menyebabkan keganasan. Gen MYC sendiri merupakan protein yang yang mengaktifkan transkripsi dari gen lain. Gen yang diaktifkan oleh MYC termasuk beberapa growth-promoting gen, termasuk Cyclin-dependent kinase, yang dimana produk tersebut mempercepat siklus sel. Protein ini juga mengontrol jalur yang mempengaruhi transkripsi asam amino, lemak, dan nukleotida yang diperlukan dalam pertumbuhan sel dan pembelahan sel. Sehingga dapat disimpulkan apabila terjadi disregulasi terhadap transkripsi dari gen ini dapat menyebabkan pembentukan tumor dan memicu jalur lain yang menyebabkan bertambahnya growth factor.(Hoppe-Seyler et al., 2018; Kumar et al., 2017a)

2.2.3. Grading Lesi Prekanker Serviks

Cervical Intraepithelial Neoplasma dibagi menjadi derajat 1-3 atau ringan, sedang dan berat. CIN 3 tidak hanya mencakup displasia berat tetapi juga karsinoma insitu serviks. Lesi intraepithelial dapat juga dibagi menjadi lowgrade squamous intraepithelial lesion dan high grade squamous intraepithelial lesion.(Carcangiu et al., 2014; Damjanov & Fan, 2007)

CIN 1- mild sqamous dysplasia. Lesi ini disebabkan oleh infeksi HPV yang menyebabkan proliferasi sel pada sepertiga bawah dari epitel. Pada lapisan tersebut,

sel tampak lebih besar dan kehilangan polarisasi, tetapi pada duapertiga atas masih dapat dibedakan dan masih tampak adanya maturasi. Sel tampak membesar dan hiperkromatik. Pada duapertiga bawah sel tampak memiliki rasio inti sitoplasma yang meningkat. Pada sepertiga atas, perbesaran sel tampak adanya koilositosis. Koilositosis tampak sebagai sitoplasma yang jernih dan mengandung inti yang hiperkromatik dengan kontur yang ireguler. Inti tampak berada ditengah. Mitosis dapat ditemukan tetapi terbatas pada lapisan basal dan tidak tampak adanya atipia.

CIN2- moderate squamous dysplasia. Pada lesi ini tampak adanya sel atipik dan kehilangan polaritas sel pada duapertiga bawah lapisan epitel. Pada sepertiga atas tampak lapisan epitel yang masih baik dengan adanya maturasi squamous yang baik. Inti tampak membesar, atipik, hiperkromatik. Mitosis terbatas pada sepertiga lapisan bawah epitel. Mitosis yang abnormal dapat ditemukan.

CIN3-severe squamous dysplasia/carcinoma insitu. Epitel tidak tampak adanya maturasi. Dari bawah sampai atas mengandung sel-sel atipik yang memiliki rasio inti sitoplasma yang meningkat. Basaloid sel tampak memiliki inti spindel atau bentuk yang irregular dengan inti yang hiperkromatik dan besar, tidak beraturan dan tanpa adanya polarisasi. Aktifitas mitosis banyak dan ditemukan pada semua lapisan sell. Permukaan tampak mengalami fokal parakeratosis atau hiperkeratosis. Mitosis abnormal sering ditemukan.

Karsinoma skuamous serviks dibagi menjadi 3 grade. Grade 1-well differentiated squamous cell carcinoma. Ditandai dengan tumor yang tersusun dari sel skuamous epitel normal dengan adanya pembentukan massa keratin lamelar dan masih adanya intercellular bridge. Tumor memiliki sitoplasma eosinophilic. Inti tampak sedikit atipia dengan adanya nukleoli prominent dan mitosis. Grade 2-moderately

differentiated squamous cell carcinoma. Tumor tersebut tersusun dari sel yang memiliki sitoplasma dan inti yang pleomorfik. Differensiasi skuamous dari sel masih dapat dikenali dengan sebagian pembentukan keratin pearls masih tampak dan adanya sel yang mengalami keratinisasi. Mitosis dapat mudah diidentifikasi. Grade 3-poorly differentiated squamous cell carcinoma. Tumor tersebut tersusun dari sel dengan rasio inti sitoplasma yang tinggi, tampak adanya pleomorfisme inti dan mitosis yang banyak. Tidak tampak adanya pembentukan mutiara tanduk. Kadang-kadang tumor yang berbentuk spindel ditemukan yang menyerupai sarcoma.(Carcangiu et al., 2014; Damjanov & Fan, 2007)

2.2.4. Staging Kanker Serviks

Klasifikasi staging digunakan untuk menentukan luas atau ekstensi kanker dan nilai prognostik dari pasien. Sistem prognostik yang digunakan untuk keganasan pada serviks yaitu menggunakan sistem TNM yang dibuat oleh The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).(Bhatla et al., 2019)

Stage 1 : Karsinoma yang terbatas pada serviks uteri (ekstensi ke korpus uterus dapat diabaikan)

- IA. Karsinoma invasif didiagnosis hanya dengan mikroskop, dengan kedalaman invasi maksimum 5mm
 - IA1. Invasi stroma tidak lebih dari 3,0 mm kedalamannya
 - IA2. Invasi stroma lebih atau sama dengan 3 mm dan kurang dari 5mm
- IB. Karsinoma invasif dengan invasi terdalam lebih atau sama dengan 5mm (lebih dari IA), lesi terbatas pada serviks uteri.
 - IB1. Karsinoma invasif dengan kedalaman invasi stromal lebih atau sama dengan dari 5mm dan kurang dari 2 cm pada dimensi terluas

- IB2. Karsinoma invasif lebih dari 2 cm dan kurang dari 4 cm pada dimensi terluas.

- IB3. Karsinoma invasif lebih atau sama dengan 4cm pada bagian terluas

Stage II : Karsinoma yang menginvasi uterus, tetapi tidak meluas ke sepertiga bawah vagina atau dinding pelvis.

- IIA. Keterlibatan terbatas pada duapertiga atas vagina tanpa keterlibatan parametrial

- IIA1. Karsinoma invasif yang kurang dari 4 cm pada dimensi terbesar

- IIA2. Karsinoma invasif dengan ukuran 4 cm atau lebih pada dimensi terbesar.

- IIB. Dengan keterlibatan parametrium tetapi tidak sampak ke dinding pelvis

Stage III : Karsinoma melibatkan sepertiga bawah dinding vagina dan/atau meluas ke dinding pelvis dan/atau menyebabkan hydronephrosis atau tidakberfungsinya ginjal dan/atau melibatkan pelvis dan/atau limphonode para aorta

- IIIA. Karsinoma melibatkan sepertiga dinding bawah vagina, tanpak ekstensi ke dinding pelvis

- IIIB. Meluas ke dinding pelvis dan atau hydronephrosis atau ginjal yang tidak berfungsi

- IIIC. Keterlibatan pelvis dan/atau limphnode paraaorta, terlepas dari ukuran tumor dan perluasan

- IIIC1. Hanya metastasis ke kelenjar getah bening pelvis.

- IIIC2. Metastasis ke kelenjar getah bening para aorta

Stage IV : Karsinoma telah meluas ke rongga pelvis atau melibatkan (dibuktikan dengan biopsi) mukosa dari bladder atau rektum.

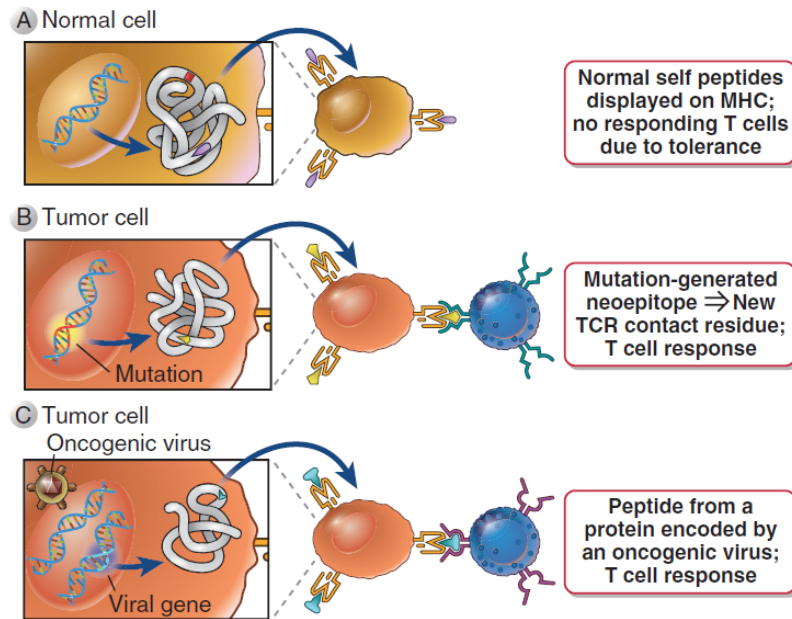
- IVA. Menyebar ke organ sekitar
- IVB. Menyebar ke organ jauh

2.3. Aspek Immunologi Keganasan Serviks

2.3.1. Antigen tumor

Sebagian besar antigen tumor dapat menghindari sistem imun karena merupakan hasil mutasi protein yang normal terdapat dalam tubuh, sehingga tidak dikenali sebagai benda asing. Pada beberapa kasus, mutasi dapat menghasilkan neoantigen. Neoantigen merupakan mutasi pada protein yang dapat menghasilkan ketidakstabilan genetik dan dapat dikenali oleh sistem imun tubuh. Neoantigen ini dapat dipresentasikan lewat MHC kepada sel T sebagai benda asing. Sebagian besar neoantigen ini biasanya berada di sitoplasma ataupun protein inti dan didegradasi oleh proteosome dan dipresentasikan pada MHC klas I. Setelah difagositosis oleh sel dendritik dapat masuk ke MHC klas II dan mengaktifkan jalur immunitas adaptif.

Antigen yang dapat ditemukan pada sel tumor lainnya dapat berasal dari protein yang dihasilkan oleh virus yang bersifat onkogenik. Dipahami sebelumnya beberapa virus dapat menyebabkan suatu keganasan seperti Human Papilloma Virus yang berhubungan dengan keganasan serviks, oropharing, dan lokasi lainnya. Sebagian besar tumor yang diinduksi virus dna akan menghasilkan antigen di sitoplasma ataupun inti sel. Protein ini dapat dipresentasikan oleh molekul MHC pada permukaan tumor.



Gambar 4. Antigen pada sel tumor.(Abbas et al., 2018)

2.3.2. Respon imun terhadap tumor

Secara umum “cancer immunoediting” dibagi menjadi 3 proses yaitu fase eliminasi, equilibrium, dan escape.(Dunn et al., 2002)

Fase Eliminasi

Fase ini merupakan fase eliminasi, dimana ketika suatu tumor dapat dikenali oleh sistem imun dan dapat berhasil dieliminasi, maka sel tumor tersebut mengalami suatu proses editing dan tidak melewati tahap selanjutnya. Apabila sel tumor menjapai ukuran tertentu, tumor tersebut membutuhkan pasokan nutrisi yang cukup sehingga akan terbentuknya protein-protein angiogenik seperti Vascular Growth Factor. Selain itu pada kondisi lainnya pertumbuhan invasif menyebabkan kerusakan jaringan sekitar, seperti diketahui sebelumnya kerusakan jaringan akan mengaktifkan sistem imun innate (seperti sel dendritik, makrofag, dan natural killer). Aktifitas dari sistem immune innate akan menghasilkan interferon gamma. Interferon ini akan menyebabkan kematian tumor melalui mekanisme apoptosis dan

antiproliferatif. Beberapa sitokin dan kemokin lain juga terbentuk dalam proses ini seperti CXCL 10, CXCL 9, dan CXCL 11. Kemokin ini dapat bersifat sebagai angiostatik dan menghambat pembentukan pembuluh darah dalam tumor dan menyebabkan kematian dari sel tumor. Kemokin yang dihasilkan dalam proses aktifitas sistem immune inate akan memproduksi kimokin dan juga menarik sel NK dan makrofag. Selanjutnya Sel NK akan berinteraksi bersama dengan makrofag memproduksi interferon gamma dan Interleukin 12. Pada saat proses pembersihan debris nekrotik akibat apoptosis pada kelenjar limfe akan menginduksi sel Thelper CD4 spesifik tumor dan mengaktifasi perkembangan sel T CD8 yang spesifik untuk sel tumor. Pada fase ini sel TCD8 dan CD4 akan menetap pada lokasi sel tumor dan mengeliminasi antigen dari tumor tersebut.(Abbas et al., 2018; Dunn et al., 2002)

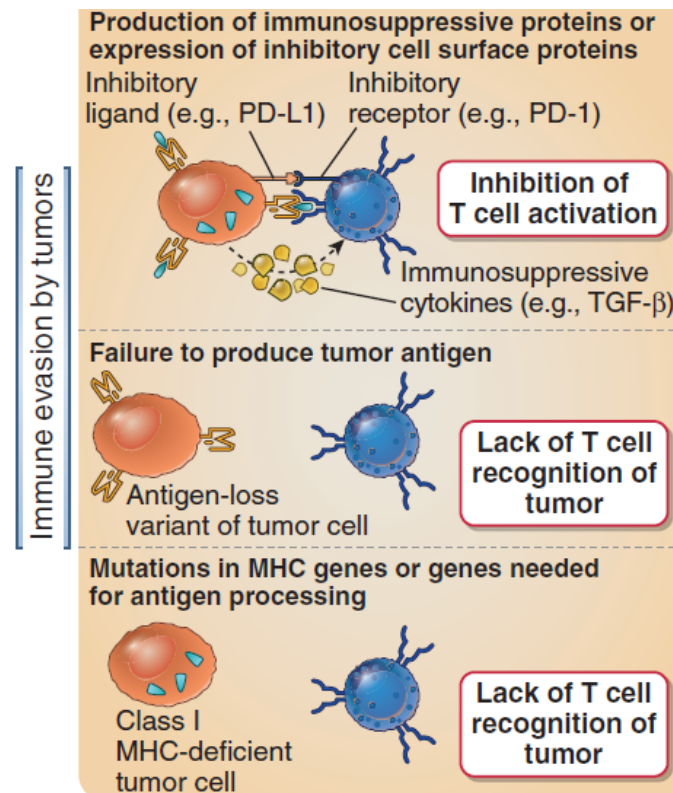
Fase Equilibrium

Pada fase ini tumor yang lewat dari fase eliminasi akan masuk ke dalam fase equilibrium dimana sel-sel limfosit dan sel interferon gamma menghambat pertumbuhan dan mengeliminasi tumor tetapi tidak dapat mengeliminasi seluruh sel tumor. Beberapa sel tumor pada fase ini akan mengalami mutasi secara genetik dan resisten terhadap respon imun. Pada fase ini sel tumor yang masih dapat dieliminasi akan tereliminasi, sedangkan sel tumor yang sudah mengalami mutasi akan bertahan dan berproliferasi. Periode ini merupakan fase terpanjang dan dapat berlangsung bertahun-tahun(Dunn et al., 2002)

Fase Escape

Pada fase ini sel tumor yang telah diseleksi dapat berkembang.(Dunn et al., 2002) Adanya defek dari sistem imun ini muncul ketika perubahan genetik membuat sel tumor resisten terhadap deteksi atau eliminasi sistem imun. Pada fase ini sel tumor

dapat menghindari sel imun dengan tiga jalur yaitu tumor tidak memproduksi antigen yang dapat dikenali oleh sel T, terjadinya mutasi pada MHC sehingga tidak dibentuknya MHC klas I yang berfungsi untuk pengenalan terhadap sel T, dan dengan diproduksinya protein yang bersifat immunosupersif seperti TGF- β atau mengekspresikan inhibitor pada permukaan sel seperti PD-L1(Abbas et al., 2018)



Gambar 5. Mekanisme resistensi sel tumor terhadap sistem pertahanan tubuh.(Abbas et al., 2018)

2.3.3. PDL1, regulasi, signaling

PD-1 merupakan suatu protein transmembran tipe1 yang dikode oleh gen PDCD1. Struktur PD-1 terdiri dari suatu extracelular IgV domain, suatu regio transmembran hidrofobik, dan intacellular domain. Intracellular tail meliputi suatu bagian yang potensial fosforilasi yang berlokasi pada immune receptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) dan immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). ITSM aktif penting untuk efek inhibitor PD-1 terhadap sel T. PD-1 memiliki dua ligan yaitu

PD-L1 juga disebut B7-H1; (CD274) dan PD-L2 (B7-DC; CD273), yang keduanya merupakan coinhibitor.(J. He et al., 2015)

PD-L1 dikode oleh gen CD274 yang berada pada kromosom 9 manusia pada band p24. PD-L1 adalah protein 40kDa yang mengandung 290 asam amino. Regio promoter dari gen CD274 mengandung beberapa elemen yang berrespon terhadap IFN- γ , dimana interferon diperlukan untuk upregulasi ekspresi PD-L1 yang dimediasi oleh IFN- γ .(Guo et al., 2017) PD-L1 berperan sebagai protein transmembran yang terdiri dari satu regio transmembran dan dua extracellular domain, Ig-C dan Ig-V. PD-L1 juga memiliki cytoplasmic domain yang pendek dan menyalurkan sinyal intraselular. Gen CD274 yang mengkode protein PD-L1 terdiri atas 7 ekson yang masing-masing ekson mengkode bagian tertentu dari protein PD-L1.(J. Chen et al., 2016; Q. Wang et al., 2017)

Program Death-Ligand 1 (PD-L1; B7-H1 dan CD274) terekspresi pada sel tumor, sel T dan sel B, makrofag, dan beberapa sel lainnya. (Wang et al., 2016)PD-L1 terdapat pada membran plasma dan sitoplasma sel kanker, tapi tidak semua kanker atau tidak semua sel dalam suatu kanker mengekspresikan PD-L1. Ekspresi PD-L1 dipicu oleh molekul proinflamatori yang multipel, termasuk IFN- γ tipe I dan II, TNF- α , LPS, GM-CSF, dan VEGF, begitu pula dengan sitokin IL-10 dan IL-4, dimana IFN- γ merupakan pemicu yang paling poten yang dihasilkan oleh sel T yang teraktivasi. (He et al., 2015)Sementara itu, berbeda halnya dengan PD-L1 yang dapat terekspresi pada sejumlah tipe sel tertentu, ekspresi PD-L2 sangat terbatas pada Antigen Presenting Cells(APC).(J. Chen et al., 2016)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 diregulasi oleh beberapa signalling pathway, faktor transkripsional, dan faktor epigenetik.(Sun et al., 2018)

1. Signalling Pathway

MAPK Pathway

Aktivasi MAPK signalling pathway dapat menyebabkan upregulasi ekspresi PD-L1. MAPK pathway berperan dalam upregulasi PD-L1 melalui aktivasi onkogenik dari EGFR pada non small cell lung carcinoma (NSCLC). MAPK pathway juga terlibat dalam upregulasi PD-L1 pada sel-sel kanker yang mendapatkan terapi obat kemoterapi. Contohnya, paclitaxel menyebabkan ekspresi PD-L1 yang dihilangkan oleh MEK inhibitor U0126. Selain itu, konsentrasi cisplatin juga memicu ekspresi PD-L1 melalui aktivasi MAPK.

PI3K/Akt Pathway

Peranan PI3K/Akt pathway dalam regulasi PD-L1 pada sel kanker pertama kali dicetuskan oleh penemuan bahwa penambahan PI3K inhibitor pada sel-sel melanoma yang resisten terhadap BRAF inhibitor menyebabkan pengurangan ekspresi PD-L1. Hal ini didukung oleh observasi bahwa penurunan PTEN menyebabkan upregulasi PD-L1 yang dihapus oleh inhibisi Akt. Menariknya, meskipun upregulasi transkripsional telah menunjukkan berkaitan dengan peningkatan PD-L1 yang diperantarai oleh PI3K/Akt, mekanisme posttranslational juga terlibat, aktivasi Akt pada sel-sel kanker kolon menyebabkan upregulasi protein PD-L1 tanpa mempengaruhi level dari ekspresi mRNA PD-L1. Tampaknya, pathway

PI3K/Akt meregulasi ekspresi PD-L1 baik melalui mekanisme transkripsional maupun posttranslational dengan cara yang tergantung tipe sel dan jaringan. Sementara inhibisi Akt menyebabkan penurunan ekspresi PD-L1, efektor downstream mTOR/S6 tidak menunjukkan sebagai perantara Akt dalam menyebabkan ekspresi PD-L1. Sebaliknya, NF- κ B yang merupakan target downstream dari Akt, menunjukkan meregulasi ekspresi PD-L1. Akt mengaktivasi NF- κ B, yang menyebabkan upregulasi PD-L1 secara transkripsional.

2. Faktor Transkripsional

HIF-1 (hypoxia-inducible factor alpha)

Peningkatan level HIF-1 berhubungan dengan peningkatan ekspresi PD-L1, mengarahkan bahwa lingkungan yang hipoksia menyebabkan peningkatan ekspresi HIF-1, dan juga dapat menyebabkan penekanan sistem imun dalam hal memicu proliferasi sel dan menghambat apoptosis. HIF-1 meregulasi PD-L1 dengan berikatan dengan hypoxia response element (HRE) dari promotor PD-L1 untuk mengaktifkan transkripsi PD-L1.

STAT3

STAT3 telah dibuktikan berikatan dengan promotor PD-L1 untuk meregulasi ekspresi PD-L1 secara transkripsional. Latent membran protein 1 (LMP1) dari virus Epstein Barr (EB) meningkatkan ekspresi PD-L1 seiring dengan peningkatan phosphorylated STAT3 (pSTAT3) dan inhibisi dari pSTAT3 inhibitor oleh JAK3 inhibitor CP-690550 mengurangi LMP1 menyebabkan ekspresi PD-L1.

NF- κ B

NF- κ B yang merupakan faktor transkripsional umum terlibat dalam ekspresi PD-L1 yang dipicu oleh LMP1 sebagai NF- κ B inhibitor caffeic acid phenethyl ester menurunkan picuan PD-L1. NF- κ B juga sebagai mediator utama dari ekspresi PD-L1 yang dipicu oleh INF γ .

Interaksi PD-L1 pada sel T efektor dengan PD-1 akan menghambat transduksi sinyal TCR, menyebabkan inhibisi aktivitas sitotoksik sel T. SHP-1 dapat meregulasi aktivitas sel T CD8⁺ dan melakukan inhibisi SHP-1 melalui sodium stibogluconate meningkatkan fungsi tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) dan immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM). ITSM dapat menyebabkan terjadinya fosforilasi tyrosine pada ITSM motif dari PD-1, kemudian mengambil SHP-1 dan SHP-2 ke ITSM motif. Setelah pengambilan tersebut, jalur signaling dapat menghambat stop signal, dan menghambat interaksi sel T dan sel dendritik. Akhirnya, blokade transduksi signal TCR menyebabkan inhibisi PI3K/Akt (Akt dikenal sebagai Protein kinase B) dan mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling. Dan yang terpenting, inhibisi aktivasi PI3K menekan ekspresi B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl) dan aktivasi Akt, yang akhirnya akan menyebabkan peningkatan apoptosis sel T. (Guo et al., 2017)

2.4. Perananan Micro RNA terhadap ekspresi PD-L1

2.4.1. MicroRNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) merupakan asam nukleat; bersamaan dengan protein dan karbohidrat, asam nukleat adalah makromolekul esensial bagi seluruh makhluk hidup yang diketahui. Kebanyakan molekul DNA terdiri dari dua unting biopolimer yang berpilin satu sama lainnya membentuk heliks ganda. Dua unting DNA

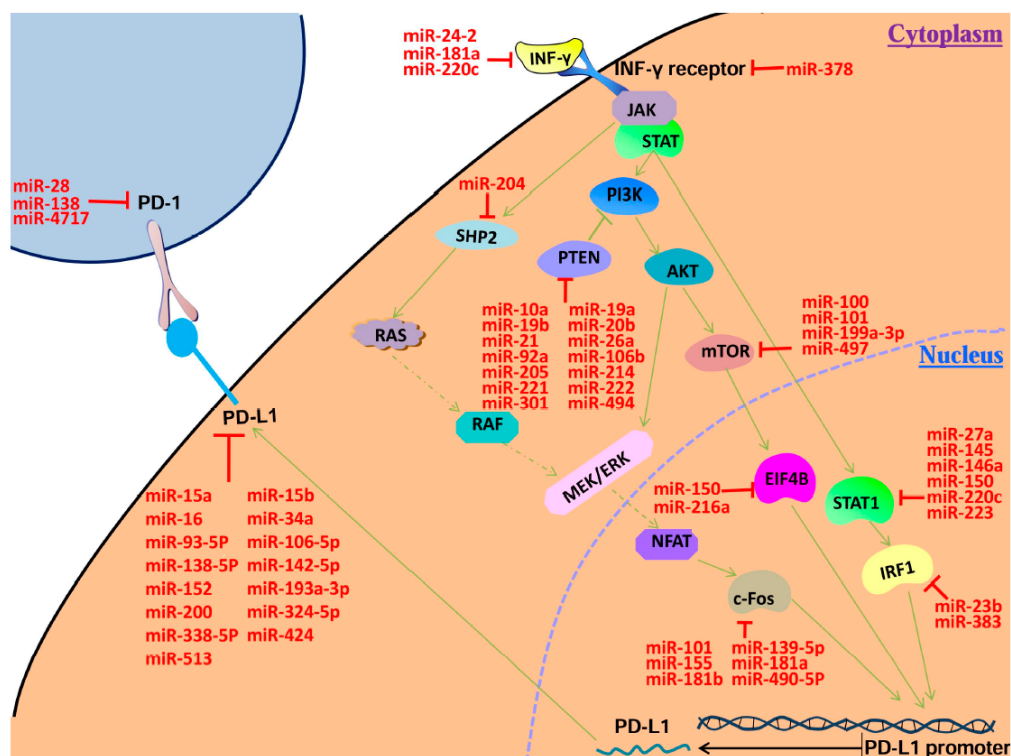
ini dikenal sebagai polinukleotida karena keduanya terdiri dari satuan-satuan molekul yang disebut nukleotida. Tiap-tiap nukleotida terdiri atas salah satu jenis basa nitrogen (guanina (G), adenina (A), timina (T), atau sitosina (C)), gula monosakarida yang disebut deoksiribosa, dan gugus fosfat. Nukleotida-nukleotida ini kemudian tersambung dalam satu rantai ikatan kovalen antara gula satu nukleotida dengan fosfat nukleotida lainnya. Hasilnya adalah rantai punggung gula-fosfat yang berselang-seling. Menurut kaidah pasangan basa (A dengan T dan C dengan G), ikatan hidrogen mengikat basa-basa dari kedua unting polinukleotida membentuk DNA unting ganda.

Secara umum DNA manusia memiliki 3,2 juta pasang basa dimana hanya sekitar 20.000nya saja yang mengkode protein yang fungsional dan terdapat dalam struktur tubuh manusia atau sekitar 1,5%. Selebihnya atau sekitar 98,5 persen genom manusia tidak mengkode protein. Tetapi sekarang didapatkan bahwa 85% dari genom manusia juga ikut ditranskripsikan dan 80%nya bertugas untuk mengatur transkripsi gen. Secara umum protein yang tidak ditranskripsikan berfungsi sebagai promoter dan enhancer dari faktor transkripsi, tempat melekatnya protein yang mengatur dan menjaga urutan dari struktur kromatin, mengatur aktifitas RNA, sebagai media transport dari elemen., dan termasuk telomer dan centromere. Banyak dari variasi genetik atau kelainan genetik terletak pada non coding regions dari genom. Salah satu contoh dari genom yang ditranskripsikan tetapi tidak ditranslasikan adalah Micro-RNA(miRNA).(Kumar et al., 2014)

Salah satu fungsi yang telah diketahui dari miRNA adalah regulasi dari proses transkripsi. miRNA adalah RNA yang relatif pendek yaitu sekitar 22 nukleotida yang memiliki fungsi utama untuk mengatur translasi dari target mRNA menjadi protein. Posttranscriptional silencing oleh miRNA merupakan hal yang fundamental dan

berfungsi mengatur translasi pada semua eukariotik. Pada genom manusia terdapat sekitar 6000 miRNA yang telah diketahui, sekitar 3,5kali lipat lebih sedikit dibandingkan dengan gen yang mengkode protein. Satu miRNA dapat meregulasi dari beberapa gen yang mengkode protein, memungkinkan tiap miRNA membantu mengatur seluruh aktifitas dari ekspresi gen. Transkripsi dari gen miRNA menghasilkan pri-MRNA selanjutnya akan berubah menjadi pre-miRNA dan oleh protein eksport akan dibawa menuju sitoplasma dari membran sel. Pre-miRNA selanjutnya akan berikatan dengan dicer dan akan berubah menjadi miro RNA dengan nukleotida sepanjang 21-30 nukleotida. Mi-RNA ini akan berikatan dengan protein dan menjadi RISC complex. RISC complex ini apabila berikatan dengan mRNA akan dapat memotong mRNA atau menghambat proses dari translasi. (Kumar et al., 2014) Karena efek inilah maka peran dari miRNA menjadi sangat penting dalam proses translasi.

2.4.2. Hubungan antara micro RNA dan PD-L1



Gambar 6. Signaling pathway dan microRNA yang berperan.(Q. Wang et al., 2017)

Mikro RNA berperan dalam meregulasi ekspresi protein PD-L1 secara langsung pada mRNA PD-L1 3'UTR melalui miRNA-15a dan miRNA-16. Selain itu overekspresi dari miR-34a menyebabkan menurunnya ekspresi dari PD-L1 bersamaan dengan miRNA93-5p dan miRNA 106-5p. Peranan miRNA terhadap ekspresi PD-L1 secara tidak langsung juga dapat dilihat dari fungsi miRNA yang meregulasi dari INF- γ , dimana miRNA-24-2, miRNA-181a, dan miRNA-220c berperan, sedangkan untuk reseptornya regulasinya akan dihambat oleh miRNA378. Aktifitas interferon akan meningkatkan ekspresi dari PD-L1, dengan terhambatnya ikatan antara ligan dan reseptor interferon maka akan berkurangnya ekspresi dari PD-L1. Pada jalur lain ekspresi PD-L1 juga dipengaruhi oleh jalur PI3K-AKT dimana akan melibatkan protein mTOR yang dapat dihambat oleh miRNA-100, miRNA-101, miRNA-199a-3p, dan miRNA-497. Jalur ini juga dipengaruhi oleh aktifitas PTEN, dimana PTEN berperan menghambat jalur PI3K-AKT. Translasi PTEN dipengaruhi oleh berbagai miRNA antara lain miRNA-10a, miRNA-19a, miRNA-19b, miRNA-20b, miRNA-92a, miRNA-106b, miRNA-205, miRNA-214, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-301, miRNA-494.(Sun et al., 2018; Q. Wang et al., 2017) Selain itu PTEN juga dihambat oleh miRNA-18b.(P. Dong et al., 2018) Ekspresi PD-L1 juga dipengaruhi secara langsung oleh miRNA-140, miRNA-142, miRNA-340, dan miRNA-383 dimana miRNA tersebut berperan menghambat terbentuknya PD-L1.(P. Dong et al., 2018) PTEN dipengaruhi oleh miRNA-18a, miRNA 18a bersifat mendownregulasi translasi protein PTEN.

2.4.3. Micro RNA pada HPV

Seperti yang telah diketahui bahwa protein E6/E7 bertanggung jawab dalam proses tumorigenesis melalui interaksi langsung terhadap tumor suppressor gen yaitu TP53 dan RB1. Selain itu protein E6 dan E7 juga berinteraksi terhadap noncoding RNA termasuk micro RNA.⁸ Infeksi HPV 16 dan 18 meregulasi beberapa miRNA sel host. Penelitian sebelumnya didapatkan bahwa infeksi tersebut menyebabkan berkurangnya sekitar 20 jenis miRNA termasuk miRNA-24a dan meningkatkan 22 jenis miRNA termasuk miRNA-16. Dari ke 42 miRNA tersebut, sebagian besar disebabkan oleh miRNA yang dibawa oleh HPV, hanya sebesar 13 miRNA host yang secara spesifik diregulasi oleh infeksi HPV.(X. Wang et al., 2014)

Protein yang ditemukan pada infeksi HPV yaitu protein E6 dan E7 juga mempengaruhi dalam regulasi miRNA host. Seperti protein E6 menurunkan ekspresi miRNA-34a, sedangkan protein E7 tidak mempengaruhi miRNA tersebut. Sebaliknya protein E7 secara signifikan meningkatkan ekspresi miRNA-25, sedangkan protein E6 tidak memiliki pengaruh. Protein E7 lebih memberikan efek positif pada ekspresi miRNA-16 dan miRNA-378. Sedangkan untuk miRNA-92a tidak ada perbedaan antara protein E6 dan E7. Sedangkan efek downregulasi dari E6 dan E7 sama pada miRNA-22, miRNA-27a, miRNA-29a, dan miRNA-100. Khusus pada miRNA-22 dan miRNA-27a efek dari protein E7 lebih kuat daripada protein E6.(X. Wang et al., 2014)

Pada penelitian lainnya didapatkan supresi dari miRNA-140, miRNA-142, miRNA-340, dan miRNA-383 pada pasien dengan keganasan skuamous serviks tetapi tidak pada lesi premaligna serviks.(P. Dong et al., 2018; Y. He, Lin, Ding, Liu, Luo, Huang, Xu, Kim, Etheridge, Lin, et al., 2016) Sedangkan pada keganasan skuamous serviks terdapat peningkatan dari miRNA-18a yang akan mendownregulasi dari PTEN.(P. Dong et al., 2018)

Tabel 1. miRNA yang mengalami perubahan ekspresi

pada sel yang terinfeksi Human papilloma virus.

Nama	Ekspresi	Dipengaruhi
miRNA-15a	Up	
miRNA-15b	Up	
miRNA-16	Up	E7
miRNA-18a	Up	
miRNA-25	Up	E7
miRNA-92a	Up	E6 dan E7
miRNA-93	Up	
miRNA-106b	Up	
miRNA-210	Up	
miRNA-224	Up	
miRNA-378	Up	E7
miRNA-22	Down	E7 > E6
miRNA-24	Down	
miRNA-34a	Down	
miRNA-27a	Down	E7 > E6
miRNA-29a	Down	E6 = E7
miRNA-100	Down	E6 = E7
miRNA-140	Down	
miRNA-142	Down	
miRNA-340	Down	
miRNA-383	Down	

2.5. Penanganan Kanker Serviks

2.5.1. Prinsip terapi bedah

Pada stadium IA1 tanpa keterlibatan LVSI (*lymphovascular space invasion*), *cone biopsy* dapat menjadi pilihan terapi pada saat ingin mempertahankan fertilitas sedangkan histerektomi sederhana diilih apabila tidak ingin mempertahankan fertilitas. Pada saat diketahui terdaat keterlibatan LVSI atau pada stadium IA2, histerektomi radikal termodifikasi menjadi pilihan dengan batas diseksi uterus, paraservikal, dan retrouterine yang lebih kecil. Pada stadium ini, *conization* juga dapat dilakukan dengan memperhatikan keterlibatan KGB sekitar melalui *SLN mapping*

menggunakan visualisasi dengan kamera fluoresensi setelah serviks diinjeksi oleh ⁹⁹Tc.

Histerektomi radikal dengan diseksi KGB pelvis menjadi pilihan terapi pada stadium IA2, IB1, IB2, dan beberapa IB3-IIA1 dengan efek kehilangan fertilitas. Histerektomi radikal menggunakan pendekatan operasi melalui laparotomi terbuka malupun melalui pendekatan laparoskopik *minimally invasive surgery* (MIS). Apabila status fertilitas ingin dipertahankan, pendekatan operasi trakelektomi vagina radikal dapat digunakan pada pasien dengan stadium IA2 atau IB1 (diameter kurang dari 2 cm). Operasi ini mengangkat serviks, vagina bagian superior, dan ligamen sekitar. Akan tetapi, korpus uterin tetap dipertahankan. Pada stadium IIB atau lebih, histerektomi bukan menjadi pilihan. Kemoterapi menjadi terapi definitif pada stadium lanjut. (Koh et al., 2019)

2.5.2. Prinsip radioterapi

Pendekatan radioterapi umumnya menggunakan pencitraan CT scan walaupun pendekatan MRI umumnya menghasilkan hasil yang lebih baik dari segi menentukan keterlibatan jaringan lunak ataupun keterlibatan parametrial pada stadium yang lebih lanjut.

Brakiterapi merupakan salah satu terapi definitif untuk semua pasien yang memiliki keganasan serviks stadium lanjut yang tidak dapat dioperasi. Brakiterapi menggunakan prinsip pemberian terapi radiasi secara internal dengan pendekatan *intracavitary*. Pada stadium lebih lanjut, brakiterapi umumnya dipadukan dengan EBRT (*external beam radiotherapy*).

EBRT dilakukan menggunakan sinar yang diberikan dari luar tubuh pasien. EBRT dapat digunakan sebagai salah satu terpai definitif pada keganasan serviks

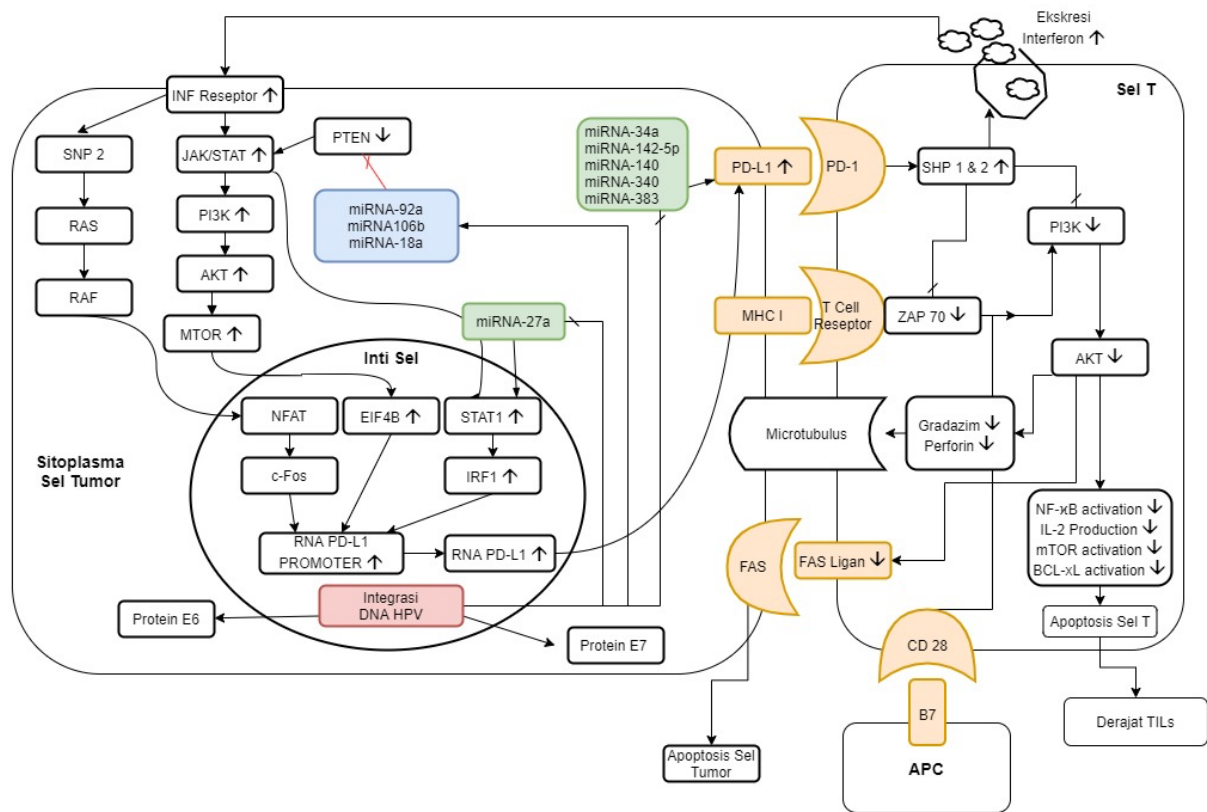
stadium lanjut, terapi adjuvant setelah histerektomi, maupun terapi radiasi yang digunakan secara intraoperatif.

Radioterapi untuk keganasan serviks umumnya dilakukan selama 8 minggu dengan kombinasi kemoterapi sesuai dengan regimen yang dijelaskan pada bagian berikutnya.(Koh et al., 2019)

Terapi sistemik (Kemoradiasi)

Terapi sistemik untuk keganasan cerviks terdiri dari regimen cisplatin, carboplatin, dan cisplatin / fluorouracil apabila dua regimen sebelumnya tidak bisa digunakan. Adapun enam regimen yang umum digunakan pada terapi kemoradiasi adalah sebagai berikut(Koh et al., 2019) Cisplatin / paclitaxel / bevacizumab; Carboplatin / paclitaxel / bevacizumab; Topotecan / paclitaxel / bevacizumab; Cisplatin / paclitaxel; Carboplatin / paclitaxel; Topotecan / paclitaxel.

2.6. Kerangka Teori



BAB III KERANGKA KONSEP

3.1. Identifikasi Variabel

Pada penelitian ini terdapat lima variable, yaitu :

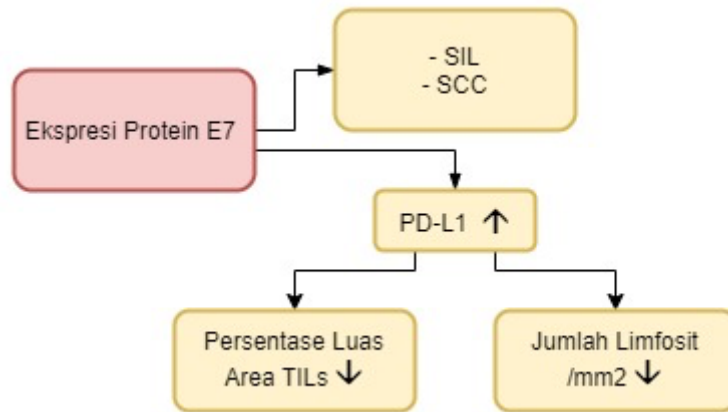
1. Ekspresi PD-L1
2. Persentase luas area TILs
3. Kepadatan sel radang mononuklear
4. Ekspresi protein E7
5. Klasifikasi Histopatologi


3.2. Klasifikasi Variabel

1. Jenis variabel berdasarkan skala pengukuran, yaitu :
 - a. Ekspresi PD-L1 : variabel nominal
 - b. Persentase luas area TILs : variabel ordinal
 - c. Ekspresi protein E7 : nominal
 - d. Kepadatan sel radang mononuklear : variabel rasio

2. Peran variabel berdasarkan fungsinya, yaitu :
 - a. Variabel bebas : Protein E7 HPV 16 dan 18
 - b. Variabel tergantung : Ekspresi PD-L1, persentase luas area TILs dan kepadatan sel radang mononuklear, persentase derajat TILs, dan diagnosa histopatologi

3.3. Kerangka Konsep



 : Variabel Bebas

 : Variabel Terikat