

**PENGARUH FREKUENSI PEMBERIAN SENYAWA 7,12
DIMETHYLBENZ (*a*) ANTHRACENE (DMBA) TERHADAP
PEMBENTUKAN TUMOR KULIT MENCIT ALBINO SETELAH
PAPARAN
12-O- TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE (TPA)**

CHAERIL ANWAR



**KONSENTRASI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS TERPADU
PROGRAM STUDI BIOMEDIKPROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

PENGARUH FREKUENSI PEMBERIAN SENYAWA 7,12-DIMETHYLBENZ (α) ANTHRACENE(DMBA) TERHADAP PEMBENTUKAN TUMOR KULIT MENCIT ALBINO SETELAH PAPARAN 12-O-TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE(TPA)

TESIS

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Derajat Magister

Program Studi Biomedik

Disusun dan Diajukan Oleh

Chaeril Anwar

Kepada

**KONSENTRASI PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS TERPADU
PROGRAM STUDI BIOMEDIK PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

TESIS

PENGARUH FREKUENSI PEMBERIAN SENYAWA 7,12-DIMETHYLBENZ (a) ANTHRACENE (DMBA) TERHADAP PEMBENTUKAN TUMOR KULIT MENCIT ALBINO SETELAH PAPARAN 12-0 TETRADECANOYLPHORBOL-13-ACETATE (TPA)

Disusun dan diajukan oleh

CHAERIL ANWAR
Nomor Pokok P1507208150

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis
pada tanggal 04 Juli 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Dr. dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K)

Ketua

Dr. dr. Anis Irawan Anwar, Sp.KK(K)

Anggota

Ketua Program studi
Biomedik,

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : **Chaeril Anwar**
No. Stambuk : P1507208150
Program studi : Biomedik/ PPDS Terpadu (Combined degree)
FK. UNHAS

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

Makassar, Juli 2013

Yang menyatakan

Chaeril Anwar

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur kepada Allah SWT atas segala berkat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini. Saya ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah berperan sehingga saya dapat menempuh Pendidikan Dokter Spesialis I sampai tersusunnya tesis ini.

Kepada Direktur Pasca sarjana Universitas Hasanuddin, Dekan Fakultas Kedokteran universitas Hasanuddin dan ketua program Pendidikan Dokter Spesialis I Fakultas kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, terima kasih atas izin dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan dokter Spesialis di bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Terima kasih yang tak terhingga saya ucapkan kepada dr. Alwi Mappiasse, Sp.KK, Ph.D, FINS DV selaku ketua bagian IKKK FK UNHAS dan kepada Dr.dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K), selaku ketua program studi IKKK FK UNHAS sekaligus sebagai pembimbing I tesis saya, atas segala perhatian dan bimbingan selama pendidikan dan penyusunan tesis ini. Kepada Dr. dr. Anis Irawan Anwar, Sp.KK(K) selaku ketua IKKK FK UNHAS periode 2008-2011 dan pembimbing II tesis saya, terima kasih atas bimbingan dan arahnya sehingga saya bisa menjadi bagian dalam keluarga besar IKKK dan dapat menyelesaikan tesis ini. Terima kasih atas para penguji saya : Prof. Dr. Gemini Alam, Msi, Apt, dr. Machmud Ghaznawie, Sp.PA(K), Ph.D, Dr. dr. Arifin Seweng, MPH yang telah berbagi ilmu dan membimbing saya sehingga tesis ini menjadi lebih baik lagi.

Kepada Dr. dr. Farida tabri, Sp.KK(K), selaku KPS periode 2008-2011 dan Prof. Dr. Muh.Dali Amiruddin, dr. Sp.KK(K), FINS DV, terima kasih atas kesempatan ilmu yang telah diberikan. Seluruh Staf pengajar bagian IKKK FK. UNHAS, terima kasih atas segala bimbingan, ilmu dan kesabaran sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini dengan lancar, semoga ilmu yang telah diberikan dapat menjadi bekal dalam menghadapi era globalisasi mendatang.

Kepada seluruh teman-teman peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis I IKKK FK UNHAS, khususnya angkatan Mi 2008, dan angkatan Januari 2008, juga teman-teman saya yang banyak membantu; dr. Martha, dr. A. Anwar Sp.KK, M.Kes, dr. Zakiani Sakka, Sp.KK, M.Kes, dr. Ninda Sari, Sp.KK, M.Kes, dr. Astrid, Sp.KK, M.Kes, dr. Arif, dr. Henky, dr. Hermanda, Sp.KK, dr. Sugiyanto, Sp.KK, M.Kes, dr. Ahmad Haykal, dan sahabat-sahabat yang lain terima kasih atas segala bantuan, semangat dan pengertiannya selama menjalani pendidikan semoga silaturahmi tetap terjaga sampai kapanpun. Terima kasih juga saya sampaikan kepada seluruh pihak yang telah banyak membantu dalam pendidikan saya; seluruh staf administrasi (Olcha. Rauf, Aldri, Ebit) dan paramedis di Rumah Sakit dr. Wahidin Sudirohusodo beserta jejaringnya.

Terima kasih dan sembah sujud kepada ibunda tercinta almarhumah Hj. Farid: Burhan yang telah melahirkan dan raembesarkan saya, semoga almarhumah mendapat tempat yang layak disisi Allah SWT, kepada ayah saya H. Anwar Usman yang telah mendukung secara moril dan material serta doanya. Kepada mertua yang saya hormati bapak H. Yudin dan Hj. Aisyah terima kasih atas dukungan dan doanya. Saya yakin akan sulit bagi saya untuk dapat

membalas semua pengorbanan yang telah diberikan kepada saya kecuali doa saya agar mereka selalu dilimpahkan kesehatan dan kebahagiaan dunia dan akhirat. Saudara-saudara ku; Farid Anwar, Emrny Fitriani Anwar Afdal Anwar, Rosihan Anwar, terima kasih atas dukungannya selama ini. Terima kasih juga kepada Pemda Provinsi Tingkat I Papua yang telah memberikan kesempatan untuk melanjutkan Program Pendidikan Dokter Spesialis, Kepada istri saya Sukmawati, SE MM terima kasih atas dukungan, pengertian dan kesabaran sehingga saya bisa menyelesaikan pendidikan, Terima kasih dan peluk eium buat anak-anakku, Nikeisha Hanifa Zahra dan M. Syafieq Muttaqin yang menjadi penyemangat agar saya segera menyelesaikan pendidikan.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan berkah dan karunia-Nya bagi kita semua.

Makassar, Juli 2013

Chaeril Anwar

ABSTRAK

CHAERIL ANWAR. *Pengaruh Frekuensi Pemberian Senyawa 7,12 Dimethybenz [α] Anthracene terhadap Pembentukan Tumor Kulit Mencit Albino setelah Pemberian 13-0-tetradecanoylphorbol-acetae (dibimbing oleh Khairuddin Djawad dan Anis Irawan Anwar).*

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh frekuensi pemberian senyawa 7,12 dimethybenz [α] anthracene terhadap pembentukan tumor kulit mencit albino setelah pemberian 13-0-tetradecanoylphorbol-acetae.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Binatang dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental murni. Sampel penelitian sebanyak 25 mencit albino terbagi atas 5 kelompok. Kelompok 1 adalah kelompok kontrol aseton. Kelompok 2 adalah 5 mencit albino dengan frekuensi satu kali paparan DMBA 50 μ g dilanjutkan tiga kali paparan TPA 4 μ g selama 10 minggu. Kelompok 3 adalah 5 mencit albino dengan frekuensi dua kali paparan DMBA 50 μ g dilanjutkan tiga kali paparan TPA 4 μ g selama 10 minggu. Kelompok 4 adalah 5 mencit albino dengan frekuensi tiga kali paparan DMBA 50 μ g dilanjutkan tiga kali paparan TPA 4 μ g selama 10 minggu. Kelompok 5 mencit albino dengan frekuensi empat kali paparan DMBA 50 μ g dilanjutkan tiga kali paparan TPA 4 μ g selama 10 minggu. Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan pewarnaan hematoksilin eosin untuk menilai gambaran histopatologi untuk identifikasi tumor kulit yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan ditemukan perbedaan bermakna pada kejadian inflamasi dan displasia sedang tidak ada perbedaan bermakna kejadian karsinoma sel skuamosa dimana hanya ditemukan 2 mencit (10%) pada frekuensi tiga kali DMBA/TPA

Kata kunci: DMBA, TPA, tumor kulit.



ABSTRACT

CHAERIL ANWAR. *Impact of Compound Administration Frequency of 7.12 Dimethybenz [α] Anthracene on Skin Tumor Formation Albino Mice after Administration of -13-0 Tetradecanoylphorbol-Acetae (supervised by Khairuddin Djawad and Anis Irawan Anwar).*

The objective of the research was to find out the impact of the compound administration frequency of 7.12 *dimethybenz [α] anthracene* on skin tumor formation albino mice after administration of -13-0 *tetradecanoylphorbol-acetae*.

The research was carried out in the Animal Laboratory, Laboratory of Anatomy Pathology, Faculty of Medicine, Hasanuddin University in Makassar. The research used was a pure experimental method. Research Samples were as many as 25 albino mice divided into 5 groups, group 1 was the acetone control group, group 2 was 5 albino mice with once exposure frequency of DMBA 50 μg , continued with the three time exposures of TPA 4 μg for 10 weeks, group 3 was 5 albino mice with two exposure frequencies of DMBA 50 μg , continued with three time exposure frequencies of TPA 4 μg for 10 weeks, group 4 was 5 albino mice with three time exposure frequencies of DMBA 50 μg , continued with three time exposure frequencies of TPA 4 μg for 10 weeks, group 5 was 5 albino mice with four time exposure frequencies of DMBA 50 μg , continued with three time exposures of TPA 4 μg for 10 weeks. The hispathology examination was conducted to identify the skin tumor formed.

The research result there is the significant difference on the inflammation and dysplasia incidents, whereas there is no significant difference on the incident of squamous cell carcinoma, in which there are only two mice (10%) on the three time frequencies of DMBA/TPA.

Key-words: DMBA, TPA, skin tumor.



DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR SINGKATAN	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	5
D. Manfaat Penelitian	7
E. Hipotesis Penelitian	7
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. <i>Tumorigenesis</i> Kulit	8
B. Karsinogenesis	10
C. Siklus Sel.....	15
D. 7,12-Dimethylbenz (a) Antrasena (DMBA)	17
E. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Asetat (TPA)	19
F. Gambaran Histopatologi Kanker Kulit	20
G. Kerangka Teori.....	22
H. Kerangka Konsep	23
BAB III. METODE PENELITIAN	24
A. Desain Penelitian	24
B. Tempat dan Waktu Penelitian	25
C. Populasi Penelitian	25
D. Sampel Penelitian	26
E. Perkiraan Besar Sampel	26
F. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	27
G. Izin Penelitian	28

H. Cara Penelitian	28
I. Skema Alur Penelitian	32
J. Identifikasi Variabel.....	33
K. Definisi Operasional	33
L. Pengolahan dan Analisis Data.....	35
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	36
A. Hasil Penelitian.....	36
B. Pembahasan.....	48
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
A. Kesimpulan.....	54
B. Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA.....	56
LAMPIRAN.....	57
Lampiran 1. Tabel Induk Sampel Penelitian.....	57
Lampiran 2. Rekomendasi Persetujuan Etik.....	59

DAFTAR TABEL

No	Halaman
1. Sebaran Inflamasi menurut Kelompok.....	37
2. Sebaran ulkus menurut kelompok.....	38
3. sebaran displasian ringan menurut kelompok.....	40
4. Sebaran displasia sedang menurut kelompok.....	41
5. Sebaran dispalsia berat menurut kelompok.....	43
6. Sebaran karsinoma sel skuamosa menurut kelompok.....	45
7. Gambaran Histopatologi Berdasarkan Frekuensi Pemberian DMBA / TPA .	47

DAFTAR GAMBAR

No	Halaman
1. 7,12-Dimethylbenz [α] anthracene (DMBA).....	18
2. Kerangka teori.....	22
3. Kerangka konsep.....	23
4. Skema alur penelitian.....	32
5. Gambaran histopatologi inflamasi.....	38
6. Gambaran histopatologi ulkus.....	39
7. Gambaran histopatologi displasia ringan	42
8. Gambaran histopatologi displasia berat.....	44
9. Gambaran histopatologi karsinoma sel skuamosa.....	46

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/ singkatan	Arti dan keterangan
CAPE	<i>Caffeic Acid Phenethyl ester</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
CHK	<i>Checkpoint Kinase</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
DMBA	<i>Dimethylbenz (a) Anthracene</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dkk	dan kawan-kawan
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FK	Fakultas Kedokteran
G	Guanine
H ₂ O ₂	Hidrogen Peroksida
HE	Hematoksilin Eosin
HMdu	<i>5-hydroxymethyl-2'deoxyuridine</i>
KSS	Karsinoma Sel Skuamosa
PAH	PoliAromatik Hidrokarbon
PG	Prostaglandin
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RS	Rumah sakit
TPA	<i>12-O- tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>

μl

mikro liter

μm

mikrometer

°C

derajat celcius

%

persen

UV

Ultra Violet

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tumor kulit dibagi mejadi dua golongan besar yaitu tumor kulit jinak dan tumor kulit ganas atau biasa disebut kanker kulit. Tumor jinak pada kulit merupakan manifestasi dari kekacauan pertumbuhan kulit yang bersifat kongenital atau akuisita, tanpa tendensi invasif dan metastasis, dapat berasal dari vaskuler dan non vaskuler. Tumor kulit jinak tumbuh secara ekspansif atau mendesak, tetapi tidak merusak struktur jaringan sekitarnya yang normal, hal ini dikarenakan tumor jinak memiliki kapsul yang membatasi antara bagian sel-sel tumor yang abnormal dengan sel-sel normal. Selanjutnya pada tumor kulit ganas (kanker kulit) yang tidak berkapsul dapat tumbuh infiltratif atau menyusup serta merusak jaringan disekitarnya (Hafner, *et.al*, 2007).

Insiden kanker kulit sebanding dengan insiden keganasan pada organ lainnya dan mewakili permasalahan kesehatan (Meeran *et al.*, 2009) *American Cancer Society* memperkirakan insiden kanker kulit mencapai 1,5 kali dari seluruh keganasan yang terdiagnosis di Amerika Serikat, yaitu lebih dari satu juta kasus kanker kulit non-melanoma (800.000-900.000 kasus karsinoma sel basal dan 200.000-300.000 kasus karsinoma sel skuamosa) dan lebih dari 62.000 kasus melanoma. (Dulgosz and Yuspa, 2008).

Karsinogen dapat meningkatkan resiko kanker dengan mengubah metabolisme seluler atau merusak DNA langsung di sel yang mengganggu proses biologis dan menginduksi pembelahan yang tidak terkendali, akhirnya mengarah pada pembentukan kanker (Sularsito, 2001)

Karsinogenesis akibat bahan kimia pada kulit tikus telah dipelajari selama beberapa dekade dan terus berkembang untuk membantu identifikasi molekul yang penting dan jalur imunologikal yang terlibat dalam keganasan kulit (Filler, *et al.*, 2007), sehingga kulit terus menjadi bagian yang penting dalam perkembangan konsep karsinogenesis baik proses biologi dan molekuler (Mackie and Quinn, 2004). Penelitian karsinogenesis akibat bahan kimia pada mencit yang dihubungkan dengan kanker pada manusia, juga diklasifikasikan menjadi inisiasi, promosi dan karsinogenesis komplis (Dulgosz and Yuspa, 2008).

Genotoksik *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) berkontribusi pada peningkatan resiko kanker kulit pada manusia dan binatang coba (Meeran *et al.*, 2009; Nigam and Shukla, 2007). Agen PAH seperti 7,12-*dimethylbenz [a] anthracene* (DMBA) sering digunakan untuk mengamati proses karsinogenesis akibat induksi bahan kimia (Yusuf, *et al.*, 2009). Aplikasi DMBA di kulit berperan sebagai inisiator yang ditunjukkan oleh adanya mutasi spesifik pada onkogen (Mackie and Quinn, 2004), selanjutnya periode laten formasi tumor setelah aplikasi inisiator berkurang secara signifikan dengan adanya aplikasi promotor seperti 12-*O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA), akibat aplikasi inisiator dan

promoter akan terbentuk suatu tumor jinak (*papilloma*), namun kemungkinan formasi papiloma pada strain tikus tergantung jenis karsinogen, dosis aplikasi dan jangka waktu pengamatan (Mackie and Quinn, 2004).

DMBA (*7,12-dimethylbenz [α] anthracene*), adalah *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* yang dipelajari secara luas telah lama dikenal sebagai penyebab kanker termasuk tumor kulit pada manusia. Telah ditemukan bahwa DMBA fototoksik pada bakteri serta dalam hewan atau sel manusia dan fotomutagenik pada galur *Salmonella typhimurium*. Iradiasi cahaya mengubah DMBA menjadi beberapa *photoproduct* termasuk *benz [α] anthracene-7,12-dion*, *7-hidroksi-12-keto-7-methylbenz [α] anthracene*, *7,12-epidioxy-7,12-dihidro*, *7-hydroxymethyl-12-methylbenz [α] antrasena* dan *12-hydroxymethyl-7-methylbenz [α] anthracene* (Yu, Yan, Jiao, Fu, 2005).

Senyawa *7,12-Dimethylbenz [α] anthracene* atau DMBA banyak digunakan di laboratorium penelitian yang mempelajari kanker. DMBA berfungsi sebagai inisiator tumor dengan membuat mutasi yang diperlukan. Promosi tumor dapat diinduksi dengan perlakuan TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) dalam beberapa model *two-stage* karsinogenesis. Hal ini memungkinkan adanya tingkat percepatan pertumbuhan tumor. Oleh karena itu, kedua jenis senyawa tersebut yaitu DMBA dan TPA perlu dikaji melalui penelitian ini sehingga diharapkan dapat mengatasi tumor kulit yang semakin berkembang yang terjadi pada manusia (Miyata, *et al*, 2001).

Hasil penelitian yang berhubungan dengan tumor kulit, antara lain: Aplikasi topikal tunggal dari *7,12-dimethylbenz [α] anthracene* (DMBA) pada mencit MT Null dengan dosis 50 dan 100 µg dan dilanjutkan satu minggu kemudian dengan TPA dengan dosis 10 µg dua kali seminggu selama 20 minggu yang menghasilkan hampir semua mencit berkembang tumor kulit (Suzuki, *et al* 2003). Pada penelitian lain digunakan DMBA dosis 1 mg dalam 50 µl aseton dengan interval tiga hari kemudian dilanjutkan dengan TPA 10 µg diaplikasikan dua kali seminggu selama 8-32 minggu tumor kulit pada mencit sebesar 34.9% (Graem, 1986).

Mencit albino yang diteliti di Makassar tidak diketahui strain atau galurnya sehingga ada kemungkinan perbedaan dosis dan frekuensi pemberian senyawa DMBA/TPA sebagai inisiator dan promotor pertumbuhan tumor oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mengetahui dosis dan frekuensi pemberian senyawa *7,12-Dimethylbenz [α] Anthracene* (DMBA) dan *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate* (TPA) terhadap pembentukan tumor kulit mencit albino dengan menggunakan mencit albino yang selama ini digunakan dalam berbagai penelitian eksperimental di Makassar.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka yang menjadi masalah pokok adalah:

Apakah ada pengaruh frekuensi pemberian senyawa *7,12-Dimethylbenz [α] Anthracene* (DMBA) terhadap pembentukan tumor kulit mencit albino setelah paparan *12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate* (TPA)?

C. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian adalah sebagai berikut:

1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh frekuensi pemberian senyawa *7,12-Dimethylbenz [α] Anthracene* (DMBA) 50 µg terhadap gambaran histopatologi kulit mencit albino setelah paparan *12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate* (TPA) 4 µg

2. Tujuan khusus

- a. Membandingkan kejadian inflamasi antara mencit albino yang diberi paparan aseton (kontrol) dengan mencit albino yang diberi paparan DMBA dosis 50 µg dengan frekuensi 1 x, 2 x, 3 x dan 4 x
- b. Membandingkan kejadian ulkus antara mencit albino yang diberi paparan aseton (kontrol) dengan mencit albino yang diberi paparan DMBA dosis 50 µg dengan frekuensi 1 x, 2 x, 3 x dan 4 x.

- c. Membandingkan kejadian derajat displasia antara mencit albino yang diberi paparan aseton (kontrol) dengan mencit albino yang diberi paparan DMBA dosis 50 µg dengan frekuensi 1 x, 2 x, 3 x dan 4 x.
- d. Membandingkan kejadian karsinoma sel skuamosa antara mencit albino yang diberi pajanan aseton (kontrol) dengan mencit albino yang diberi paparan DMBA dosis 50 µg dengan frekuensi 1 x, 2 x, 3 x dan 4 x paparan.

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Memahami mekanisme paparan senyawa DMBA/TPA yang menyebabkan karsinogenesis kulit.
2. Mengetahui dosis dan frekuensi DMBA/TPA yang paling optimal yang menyebabkan karsinogenesis kulit
3. Penelitian ini diharapkan sebagai dasar dalam penentuan dosis dan frekwensi DMBA/TPA terhadap pembentukan tumor kulit pada mencit.
4. Penelitian ini diharapkan dapat sebagai pembanding untuk penelitian lebih lanjut

E. Hipotesis Penelitian

1. Ada pengaruh frekuensi pemberian 1 x, 2 x, 3 x , dan 4 x paparan DMBA dosis 50 µg terhadap kejadian inflamasi pada kulit mencit albino
2. Ada pengaruh frekuensi 1 x, 2 x, 3 x, dan 4 x paparan DMBA dosis 50 µg terhadap kejadian ulkus pada kulit mencit albino
3. Ada pengaruh frekuensi pemberian 1 x, 2 x, 3 x, dan 4 x paparan DMBA dosis 50 µg terhadap kejadian derajat displasia pada kulit mencit albino
4. Ada pengaruh frekuensi pemberian 1 x, 2 x, 3 x, dan 4 x paparan DMBA dosis 50 µg terhadap kejadian karsinoma sel skuamosa pada kulit mencit albino

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Tumorigenesis Kulit*

Tumor merupakan sekelompok sel-sel abnormal yang terbentuk dari hasil proses pembelahan sel yang berlebihan dan tak terkoordinasi. Dalam bahasa medisnya, tumor dikenal sebagai neoplasia. Neo berarti baru sedangkan plasia berarti pertumbuhan/pembelahan, jadi neoplasia mengacu pada pertumbuhan sel yang baru yang berbeda dari pertumbuhan sel-sel di sekitarnya yang normal. Sel tubuh secara umum memiliki dua tugas utama yaitu melaksanakan aktivitas fungsionalnya serta berkembang biak dengan membelah diri, namun pada sel tumor yang terjadi adalah hampir semua energi sel digunakan untuk aktivitas berkembang biak semata. Fungsi perkembangbiakan ini diatur oleh inti sel (*nucleus*), akibatnya pada sel tumor dijumpai inti sel yang membesar karena tuntutan kerja yang meningkat (Frenkel, *et al*, 1993).

Tumor dibagi mejadi dua golongan besar yaitu tumor jinak (*benign*) dan tumor ganas (*malignant*) atau yang populer dengan sebutan kanker. Terdapat perbedaan sifat yang nyata diantara dua jenis tumor ini dan memang membedakannya merupakan tuntutan wajib bagi praktisi medis. Perbedaan utama di antara keduanya adalah bahwa tumor ganas lebih berbahaya dan fatal sesuai dengan kata ganas itu sendiri, dalam tahap

lanjut dapat mengakibatkan kematian. Tumor jinak hanya dapat menimbulkan kematian secara langsung terkait dengan lokasi tumbuhnya yang membahayakan misalnya tumor di leher yang dapat menekan saluran napas. Terdapat beberapa sifat yang membedakan antara tumor jinak dan ganas (Kimoto *et al.*, 1998).

Kanker memiliki potensi untuk menyerang dan merusak jaringan yang berdekatan dan menciptakan metastasis. Tumor jinak tidak menyerang jaringan berdekatan dan tidak menyebarkan benih (metastasis), tetapi dapat tumbuh secara lokal menjadi besar. Mereka biasanya tidak muncul kembali setelah pengangkatan melalui operasi (Teich *et al.*, 1997).

Berdasarkan jaringan awal, tumor dapat dibagi menjadi: 1) Tumor asal epitelial; 2) Tumor asal mesenkim; 3) Tumor sel darah; dan 4) Tumor sel germ. Dari keempat jenis tumor tersebut, maka yang menjadi obyek penelitian adalah tumor kulit atau tumor epitelial, dianggap ganas bila menembus basal lamina dan dianggap jinak bila tidak menembus basal lamina.

Tumor kulit disebabkan oleh mutasi dalam sel DNA kulit. Banyaknya sel yang bermutasi dibutuhkan untuk dapat memunculkan tumor. Mutasi yang mengaktifkan onkogen atau menekan gen penahan tumor akhirnya dapat menyebabkan tumor. Sel memiliki mekanisme yang memperbaiki DNA dan mekanisme lainnya yang menyebabkan sel untuk menghancurkan dirinya melalui apoptosis bila DNA sudah rusak terlalu parah. Mutasi yang menahan gen untuk mekanisme ini dapat juga

menyebabkan kanker. Sebuah mutasi dalam satu onkogen atau satu gen penahan tumor biasanya tidak cukup menyebabkan terjadinya tumor. Sebuah kombinasi dari sejumlah mutasi dibutuhkan (Yantiss, et al, 2008).

B. Karsinogenesis

Karsinogenesis adalah suatu proses banyak tahap, baik pada tingkat fenotipe maupun genotipe. Suatu neoplasma ganas memiliki beberapa sifat fenotip, misalnya pertumbuhan berlebihan, sifat invasif lokal, dan kemampuan metastasis jauh. Sifat ini diperoleh secara bertahap, suatu fenomena yang disebut *tumour progression*. Pada tingkat molekular, progresi ini terjadi akibat akumulasi kelainan genetik yang pada sebagian kasus dipermudah oleh adanya gangguan pada perbaikan DNA. Perubahan genetik yang mempermudah *tumour progression* melibatkan tidak saja gen pengendali tumor, tetapi juga gen yang mengendalikan angiogenesis, invasif dan metastasis (Kumar *et al.*, 2007). Kanker berkembang melalui serangkaian proses yang disebut dengan karsinogenesis. Dari pernyataan tersebut jelaslah bahwa kanker adalah penyakit yang timbul akibat akumulasi kerusakan-kerusakan tertentu dalam tubuh manusia.

Karsinogenesis pada dasarnya dibagi menjadi dua tahap utama yaitu inisiasi dan promosi.

1. Inisiasi Tumor

Karsinogen lingkungan yang mempunyai implikasi pada perkembangan beberapa tipe kanker adalah PAH. Enzim sitokrom P450 (CYP) mempunyai peranan penting perubahan PAH menjadi karsinogen yang berpotensi tinggi. Stres fisiologikal melepaskan mediator biokemikal yang mempengaruhi karsinogenesis. Enzim sitokrom P450 pada hati berperan pada metabolisme konversi bahan toksik lingkungan, namun regulasi enzim-enzim ini oleh faktor intrinsik seperti stres fisiologis masih kurang dipahami (Butel, 2000).

Inisiasi yaitu terjadi pajanan terbatas dengan karsinogen dalam waktu singkat. Tanpa adanya rangsangan lebih lanjut sel yang telah terinisiasi ini tidak akan tumbuh menjadi sel tumor, namun perubahan ini tetap tinggal dalam sel turunannya (*progeny*) (Sularsito, 2001, Dulgosz and Yuspa, 2008). Inisiasi tumor oleh karsinogen kimia seperti DMBA membuat stadium ireversibel yang melibatkan mutasi somatik terutama pada onkogen *Ha-ras* (Mun'im *et al*, 2006).

Mutasi sel somatik berperan penting pada inisiasi kanker dan stadium karsinogenesis lainnya. Perubahan ini timbul melalui formasi mutasi DNA yang telah dianalisis baik *in vitro* maupun *in vivo* pada tikus dan ditentukan bahwa 99% DNA yang diinduksi oleh DMBA didepunasi oleh satu elektron oksidasi yaitu 12 metil DMBA bereaksi terhadap N-7 dan adenin atau guanin dengan perbandingan 1:4. Formasi DMBA-DNA mengikat kompleks DNA (Nigam and Shukla, 2007), membentuk *carcinogen-DNA adduct* yang mempengaruhi pasangan basa normal,

distorsi *double helix* DNA dan mempengaruhi replikasi DNA (Sularsito, 2001, Dulgosz and Yuspa, 2006). Jadi inisiator menyebabkan mutasi gen (Sularsito, 2001). Hasil akhir tumor dapat berupa perkembangan ke bentuk papiloma benigna atau berkembang menjadi karsinoma sel skuamosa dan dapat juga timbul tanpa adanya lesi prekursor. Senyawa *7,12-dimethylbenz [α] anthracene* (DMBA) adalah PAH yang sangat karsinogenesis, yang berperan pada inisiasi tumor, meliputi jaringan mammae, ovarium dan kulit pada tikus (Flint, *et al.*, 2007).

2. Promosi Tumor

Tumor pada kulit dapat diinduksi secara efektif pada tikus dengan aplikasi berulang zat karsinogen (Roomi *et al.*, 2008). Agen yang membuat ekspansi klonal dari sel yang terinisiasi disebut sebagai promotor tumor. Promosi tumor adalah proses non-mutagenik, bersifat pleiomorfik yang membuat pertumbuhan aselektif menjadi sel yang terinisiasi dan reversibel pada stadium awal. Agen promotor yang memfasilitasi progresi malignansi pada umumnya bersifat genotoksik (Dulgosz and Yuspa, 2008, Kumar *et al.*, 2007). Mekanisme promosi tumor meliputi aktivasi reseptor permukaan sel, aktivasi atau inhibisi enzim sitosolik dan faktor transkripsi nuklear, stimulasi proliferasi, inhibisi sel apoptosis dan sitotoksik secara langsung (Dulgosz and Yuspa, 2008). Beda halnya dengan fase inisiasi fase promosi bersifat reversibel dan membutuhkan aplikasi berulang untuk mencetuskan tumor kulit (Roomi *et al.*, 2008).

Senyawa *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA), suatu ester turbol adalah suatu aktivator kuat *Protein Kinase C* (PKC), suatu enzim yang merupakan komponen penting pada jalur transduksi sinyal, termasuk jalur yang diaktifkan oleh faktor pertumbuhan. Klonal sel yang terinisiasi, karena dipaksa berproliferasi, mengalami mutasi tambahan yang akhirnya berkembang menjadi sel yang ganas (Kumar *et al*, 2007).

Promotor tumor kulit pada pemakaian topikal akan menimbulkan iritasi, inflamasi dan hiperplasi. Promotor mengubah lingkungan jaringan sedemikian rupa sehingga sel yang telah terinisiasi tumbuh dengan cepat (Sularsito, 2001)

Satu kali terjadi proses mutasi DNA sebenarnya belumlah cukup untuk menimbulkan kanker. Masih dibutuhkan ribuan mutasi lagi yang letaknya pada gen tidak sama. Apabila mutasi DNA yang banyak itu telah terjadi, mulailah sel berubah sifat perlahan-lahan. Sel yang termutasi tersebut mulai membelah diri (proliferasi) dan membentuk grup tertentu (klonal) di lokasi tertentu dalam tubuh. Sel tersebut akan membesar dan merusak jaringan sehat. Tahap dimana sel kanker membentuk klonal inilah yang dinamakan tahap promosi kanker. (Sularsito, 2001)

DNA merupakan target utama karsinogenesis genotoksik. Interaksi DNA tidak random dan setiap kelas agen bereaksi secara selektif dengan target pada purin dan pirimidin. Karsinogen genotoksik adalah mutagen poten, seringkali menyebabkan kegagalan pasangan, delesi kecil, sehingga terjadi mutasi *missense* atau *nonsense*. Mutasi yang terjadi

pada semua kasus tumor memperlihatkan kombinasi efek perubahan mutagenik dan produk protein dan efek perubahan fungsional dari *host*. Penggunaan kimia menginduksi tumor pada tikus secara genetik dengan cara delesi alel *H-ras*. (Dulgosz and Yuspa, 2008).

Penelitian karsinogenesis akibat bahan kimia pada kulit mencit telah menunjukkan stadium perubahan epitelial pada keganasan yang terdiri dari inisiasi, promosi dan progresi malignansi. Berdasarkan hal tersebut, bahan kimia terkait kanker pada manusia diklasifikasikan menjadi inisiator tumor, promotor tumor atau karsinogen komplet. Diketahui dari 200 bahan kimia berperan dalam perkembangan kanker pada manusia. Karsinogen kimia yang paling sering dikaitkan sebagai penginduksi kanker kulit manusia meliputi PAH dan arsenik (Dulgosz and Yuspa, 2008). Bahan-bahan tersebut merusak susunan DNA normal dan mematikan mekanisme perbaikan DNA. Sebenarnya DNA bukanlah substansi yang lemah, tetapi dilengkapi dengan mekanisme-mekanisme tertentu yang mampu menetralkan gangguan-gangguan yang terjadi sehingga tidak membawa efek negatif. Mekanisme yang dimiliki DNA tersebut adalah mekanisme DNA *repair* (perbaikan DNA) yang terjadi pada fase tertentu dalam siklus sel (Dulgosz and Yuspa, 2008).

Karsinogenesis kulit pada model mencit memerlukan suatu agen mutagenik diikuti oleh aplikasi berulang suatu agen yang menginduksi ekspansi klonal (promosi) dan sel-sel yang telah mengalami mutasi untuk membentuk suatu tumor (Ridd *et al*, 2006). Namun, insiden terjadinya

tumor kulit berbeda tergantung dan strain tikus yang telah diberi satu kali paparan DMBA dosis tertentu kemudian diikuti paparan berulang TPA dosis rendah maka persentase timbulnya papilloma 100% dan 53% pada tikus strain SENCAR dan CD 1 (sensitif TPA), 25% pada tikus FVB/N dan 17% pada tikus BAIB/c. Sedangkan aplikasi berulang dengan DMBA dosis rendah atau DMBA dosis tinggi ditambah peningkatan dosis TPA, akan memperbesar kemungkinan suatu papilloma menjadi karsinoma (Gibbs, 2000).

Berbagai karsinogen juga menyebabkan terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) selama proses metabolismenya. Kerusakan oksidatif terhadap DNA seluler mengakibatkan mutasi dan sangat berpengaruh dalam inisiasi dan progresi tahapan karsinogenesis. ROS mempengaruhi proses seluler seperti proliferasi dan apoptosis yang sangat berpengaruh pada perkembangan kanker (Salvadori, *et al.*, 2006).

C. Siklus Sel

Pembelahan sel yang menjadi tahap awal suatu proses proliferasi memiliki sistem kontrol yang disebut sebagai siklus sel. Proses ini terdiri dari fase M (mitosis) diikuti oleh fase G1 (pasca-mitosis), fase S (sintesis DNA) dan fase G2 (pertumbuhan premitotik). Beberapa sel berada dalam fase GO (istirahat) tetapi sel tersebut akan memasuki kembali siklus sel dan berproliferasi lanjut (Mitchell and Cotran, 2007).

Fase S memerlukan waktu sekitar 10 – 12 jam dan jumlah kromosom menjadi dua kali lebih banyak. Sel yang berhenti (istirahat) pada fase siklus sel tertentu disebut sebagai *cell cycle check points*. Sebelum memasuki fase S maka *Cyclin dependent kinase* (Cdk) harus berkaitan dengan siklin fase S. Apabila terjadi inhibisi ikatan siklin dengan Cdk (*Cyclin-Cdk inhibitors*) pada fase G1 sebelum memasuki fase S, maka *restriction point* kehilangan fungsinya untuk mengontrol kelainan DNA sebelum mengalami replikasi (Ponten and Lundeberg 2003, Kraemer and Runger, 2008).

Pada fase G1 (Gap 1) terdapat *check point* yaitu suatu tempat dimana susunan DNA akan dikoreksi dengan seteliti-telitinya. Apabila ada kesalahan, sel mempunyai dua pilihan yang dapat dijalankan. Pertama, kesalahan tersebut diperbaiki dengan cara mengaktifkan DNA repair. Namun, apabila kesalahan yang ada sudah tidak mampu ditanggulangi, sel memutuskan untuk mengambil pilihan kedua yaitu dimatikan daripada hidup membawa pengaruh buruk bagi lingkungan sekelilingnya. Saat itulah keputusan untuk berapoptosis diambil. Sel dengan DNA normal akan meneruskan perjalanan untuk melengkapi siklus yang tersisa yaitu: S (Sintesis), G2 (Gap 2) dan M (Mitosis) (Mitchell and Cotran, 2007).

Kerusakan DNA yang tidak diperbaiki secara adekuat akan menyebabkan perubahan fungsi sel, kematian sel, atau formasi mutasi (perubahan DNA *sequence*) pada sel-sel yang rusak. Mutasi akibat kerusakan DNA akan bertahan selama sel yang terkena masih ada.

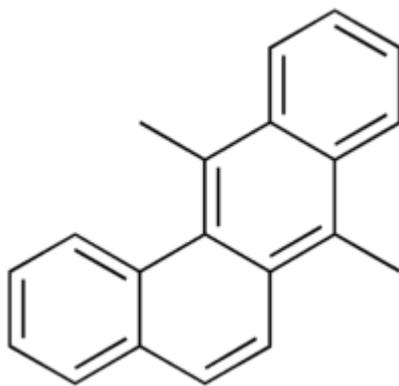
Mutasi pada gen-gen yang penting menyebabkan perubahan fungsi sel atau transformasi malignansi (Kraemer and Runger, 2008).

Apoptosis ialah proses kematian sel yang terprogram atau proses perusakan yang terkontrol terhadap diri sel itu sendiri yang mana proses tersebut melibatkan sinyal selular yang khusus atau spesifik. Apoptosis memiliki peran yang sangat penting dalam embriogenesis, penggantian jaringan yang rusak, perkembangan sistem imun, dan perlindungan melawan perkembangan tumor (*tumorigenesis*). Keseimbangan antara kematian sel apoptosis dan pertumbuhan sel menentukan tingkat pertumbuhan atau penurunan populasi sel (McGrath *et al.*, 2004, Mitchell and Cotran, 2007).

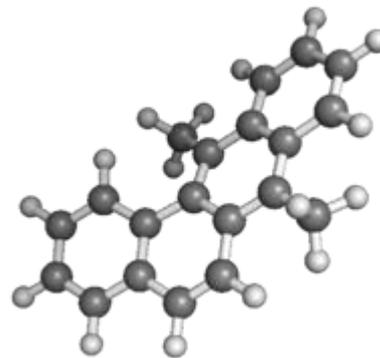
D. 7,12-Dimethylbenz [α] Anthracene (DMBA)

Senyawa 7,12-dimethylbenz [α] anthracene (DMBA) adalah zat kimia yang termasuk dalam *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH) yang dikenal bersifat mutagenik, teratogenik, karsinogenik, sitotoksik, dan immunosupresif. Menurut *Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health*, DMBA yang mempunyai 4 cincin benzene termasuk dalam tujuh PHA yang dapat menyebabkan kanker pada manusia. Secara alami DMBA dapat ditemukan di alam sebagai hasil dari proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti dalam asap tembakau, asap pembakaran kayu, asap pembakaran gas, bensin, minyak, batubara atau daging. (Lukitaningsih dan Noegrohati, 2000).

Senyawa *7,12-dimethylbenz [α] anthracene* merupakan penekan kekebalan tubuh dan organ-spesifik karsinogen laboratorium kuat. Juga dikenal sebagai *7,12-dimethylbenz [α] anthracene* atau DMBA, zat ini banyak digunakan di laboratorium penelitian banyak mempelajari kanker. DMBA berfungsi sebagai inisiator tumor dengan membuat mutasi diperlukan. Promosi tumor dapat diinduksi dengan perlakuan TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*) dalam *two-stage* karsinogenesis. Hal ini memungkinkan untuk tingkat percepatan pertumbuhan tumor, sehingga studi mengenai kanker banyak dilakukan (Muqbil *et al*, 2006).



7,12-Dimethylbenz(a)anthracene



7,12-dimethylbenzo[b]phenanthrene

Gambar 1. *7,12-Dimethylbenz [α] anthracene* (DMBA)

7,12-dimethylbenz [α] anthracene juga dilaporkan sebagai karsinogen poten pada hewan coba, dengan target utama pada kulit dan glandula mammae (Mun'im *et al.*, 2006). Dosis tinggi DMBA yang diberikan secara kronik pada hewan coba dapat menyebabkan nekrosis pada adrenal (Haschek dan Rousseaux, 1991).

Selama ini DMBA telah dibuktikan mampu menginduksi kanker glandula mammae pada hewan coba, dengan pemberian secara oral dan diberikan untuk kurun waktu tertentu (Singletary 1997). Pada tikus, DMBA muncul secara selektif dan tidak ditemukan pada sel parenkim glandula mammae. Metabolit aktif dari DMBA akan berikatan dengan DNA epitel glandula mammae (DNA *adduct*), selanjutnya ikatan dengan DNA akan turun hingga 50% 16 jam pasca paparan dengan DMBA. Namun demikian, apabila paparan DMBA dilakukan terus menerus selama 42 hari, maka akan terjadi ikatan yang menetap antara metabolit aktif DMBA dan DNA yang akan memicu munculnya kanker (Muto, 2003).

E. 12-0-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)

Senyawa 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) adalah suatu aktivator kuat *Protein Kinase C* (PKC) suatu enzim yang merupakan komponen penting pada jalur transduksi sinyal, termasuk jalur yang diaktifkan oleh faktor pertumbuhan. Klonal sel yang terinisiasi, karena dipaksa berpolimerasi, mengalami mutasi tambahan yang akhirnya berkembang menjadi sel yang ganas (Kumar *et al*, 2007).

Senyawa 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) adalah agen promosi tumor yang memfasilitasi progresi malignasi pada umumnya bersifat genotoksin. Agen promosi tumor ini bersifat *reversible* sehingga dibutuhkan paparan berulang. Promosi tumor dapat diinduksi dengan perlakuan TPA (12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate) dalam beberapa model *two- stage* karsinogenesis. Hal ini memungkinkan adanya tingkat

percepatan pertumbuhan tumor. Promosi tumor kulit pada pemakaian topikal akan menimbulkan iritasi, inflamasi dan hiperplasi. Promotor mengubah lingkungan jaringan sedemikian rupa sehingga sel yang telah terinisiasi tumbuh dengan cepat (Sularsito, 2001).

Senyawa TPA digunakan sebagai agen promosi yang dilakukan secara berulang. Aplikasi topikal dari *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE), salah satu kandungan propolis dari sarang lebah, kepada CD-1 tikus yang sebelumnya diinisiasi dengan *7,12-dimethylbenz [α] anthracene* (DMBA). DMBA menghambat promosi tumor yang diinduksi *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate* (TPA) dan pembentukan *5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine* (HMdU) dalam DNA epidermal. Hasil perlakuan menunjukkan efek penghambatan potensial dari CAPE pada perangsangan tumor yang terinduksi oleh TPA dan pembentukan HMdU yang terinduksi oleh TPA dalam DNA dari kulit tikus uji sama dengan efek penghambatan dari CAPE pada sintesis DNA, RNA dan protein dalam kultur sel-sel HeLa (Huang *et al.*, 1996).

F. Gambaran Histopatologi Kanker Kulit

Lesi kulit meliputi proliferasi papilar baik papiloma dan keratoakantoma yang dihubungkan dengan berbagai variasi dari hiperplasia epidermis dan penebalan dermal serta fibrosis serta infiltrasi sel inflamasi ringan sampai sedang (Roomi *et al.*, 2008).

Perubahan histopatologi dapat berupa perubahan displasia pada epidermis, agregasi nuklear dan variasi bentuk dan ukuran nukleus serta

hiperplasia paraneoplastik dari folikel rambut tanpa diferensiasi trichohialin. Transformasi malignansi meliputi perubahan epidermis menjadi trikofolikuloma, trikofolikulo karsinoma, karsinoma sel skuamosa dan karsinoma sel basal, kelenjar sebacea menjadi adenokarsinoma sebacea, sel adiposa menjadi liposarkoma, otot menjadi rhabdomiosarkoma dan nodus limfe subkutaneous menjadi prolimfotik limfosarkoma (El-Sherry *et al.*, 2007).

Broders membagi histopatologis KSS menjadi:(Grossman and Leffel, 2008, McKee *et al.*, 2005)

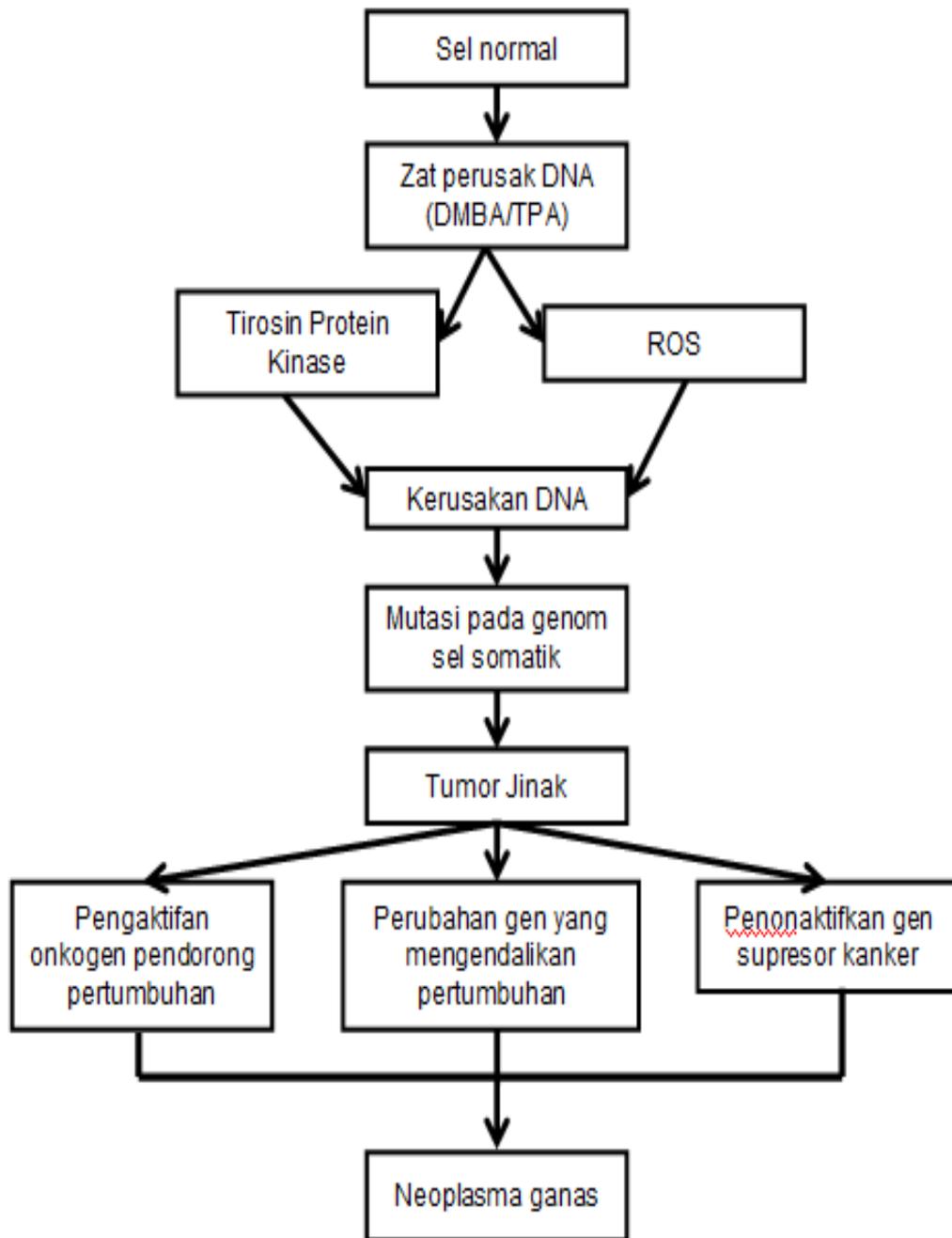
- Stadium I : $\geq 75\%$ sel berdiferensiasi
- Stadium II: $\geq 50\%$ sel berdiferensiasi
- Stadium III: 25-50% sel berdiferensiasi
- Stadium IV: $< 25\%$ sel yang berdiferensiasi

Sangat penting untuk diingat bahwa tumor juga diklasifikasikan menurut diferensiasi sel. Berdasarkan diferensiasi terbagi menjadi 3 stadium yaitu:(McKee *et al.*, 2005, Kirkham, 2005)

- *Well differentiated (low grade tumor)*: epitel skuamosa gampang dikenali, adanya sel-sel keratinisasi. Jembatan interseluler masih terlihat, tumor memperlihatkan sedikit pleimorfisme dan sedikit yang mengalami mitosis pada bagian basal. Keratinisasi sering berbentuk *horn pearl*, yang merupakan struktur karakteristik terdiri dari lapisan sel skuamosa yang tersusun secara konsentris dengan keratinisasi ke arah sentral.

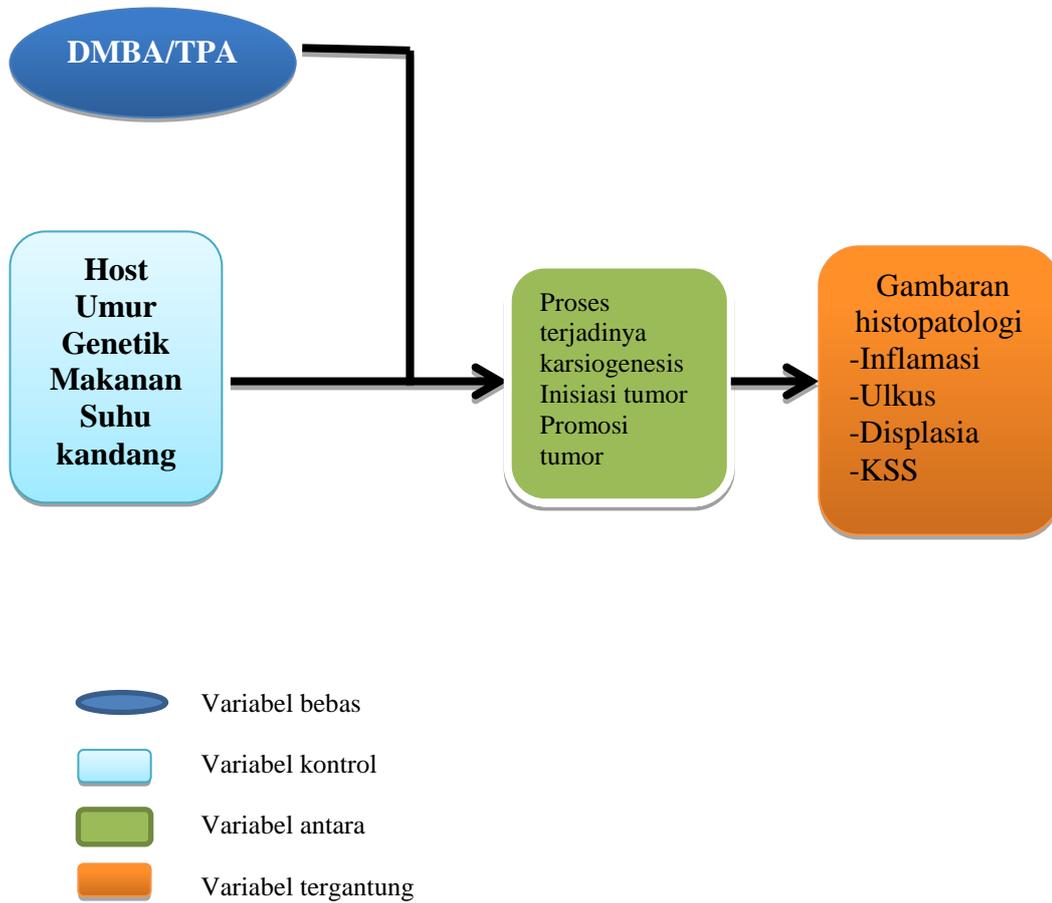
- *Moderate differentiated (moderate grade tumor)*: epitel skuamosa tidak terlalu jelas, formasi keratinisasi lebih sedikit, formasi *horn pearl* minimal. Pleomorfisme nukleus dan sitoplasma lebih terlihat dan sel mitotik (termasuk bentuk sel-sel abnormal) lebih sering terlihat.
- *Poorly differentiated (high grade tumor)*: sel atipik, hilangnya jembatan intraseluler, minimal atau tidak adanya keratinisasi.

G. Kerangka teori



Gambar 2. Kerangka teori

H. Kerangka Konsep



Gambar 3. Kerangka konsep