

DISERTASI

**IDENTIFIKASI LOKASI DAN STEM CELL ORIGIN SERTA
FAKTOR YANG MEMPENGARUHI LEMAHNYA KEMAMPUAN
METASTASIS KARSINOMA SEL BASAL**

(Studi analitik menggunakan imunohistokimia BerEP4, LGR6 dan LRIG1)

**IDENTIFICATION OF THE SITE AND STEM-CELL ORIGIN OF
BASAL CELL CARCINOMA AND THE POSSIBLE FACTORS
CAUSING ITS LOW CAPACITY TO METASTASIZE**

(Analytic study using Immunohistochemistry BerEP4, LGR6 and LRIG1)



SUKMAWATI TANSIL TAN

P20030909

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2012

DISERTASI

**IDENTIFIKASI LOKASI DAN STEM CELL ORIGIN SERTA
FAKTOR YANG MEMPENGARUHI LEMAHNYA KEMAMPUAN
METASTASIS KARSINOMA SEL BASAL**

(Studi analitik menggunakan imunohistokimia BerEP4, LGR6 dan LRIG1)

**IDENTIFICATION OF THE SITE AND STEM-CELL ORIGIN OF
BASAL CELL CARCINOMA AND THE POSSIBLE FACTORS
CAUSING ITS LOW CAPACITY TO METASTASIZE**

(Analytic study using Immunohystochemistry BerEP4, LGR6 and LRIG1)



SUKMAWATI TANSIL TAN

P20030909

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2012

**IDENTIFIKASI LOKASI DAN *STEM CELL* ORIGIN SERTA
FAKTOR YANG MEMPENGARUHI LEMAHNYA KEMAMPUAN
METASTASIS KARSINOMA SEL BASAL
(Studi analitik menggunakan imunohistokimia BerEP4, LGR6 dan LRIG1)**

DISERTASI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

**Program Studi
Ilmu Kedokteran**

Disusun dan diajukan oleh

SUKMAWATI TANSIL TAN

Kepada

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2012

LEMBAR PENGESAHAN UJIAN PROMOSI

**IDENTIFIKASI LOKASI DAN STEM CELL ORIGIN SERTA
FAKTOR YANG MEMPENGARUHI LEMAHNYA KEMAMPUAN
METASTASIS KARSINOMA SEL BASAL**
(Studi analitik menggunakan imunohistokimia BerEP4, LGR6 dan LRIG1)

Disusun dan diajukan oleh

SUKMAWATI TANSIL TAN

P020030909

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Prof. dr.Syarifuddin Wahid SpRA. Ph.D

Promotor

dr. Mahmud Ghazrawie, SpPA. Ph.D

Ko- Promotor

Prof. DR. dr. Bambang Sutrisna, MSHc(Epid)

Ko-promotor

Ketua Program Ilmu Kedokteran

Universitas Hasanuddin

Prof.DR.dr. Suryani As'ad, M.Sc, SpGK(K)

Dekan

Fakultas Kedokteran

Universitas Hasanuddin

Prof.dr.Irawan Yusuf,PhD

TIM PENGUJI

1. Prof. dr.Syarifuddin Wahid SpPA. Ph.D (Ketua/Promotor)
2. Prof. DR. dr. Bambang Sutrisna, MSHc(Epid) (Anggota/Ko- Promotor)
3. dr. Mahmud Ghaznawie, SpPA. Ph.D (Anggota/Ko-Promotor)
4. Prof.DR.dr. Suryani As'ad, M.Sc, SpGK(K) (Anggota/Penguji)
5. Prof.dr.Irawan Yusuf,PhD (Anggota/Penguji)
6. Prof.Dr.dr. Prasetyowati Subchan,SpKK (K) (Anggota/Penguji)
7. Prof.Dr.dr.Muh.Dali Amiruddin,SpKK (K) (Anggota/Penguji)
8. Prof.Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi,MM (Anggota/Penguji)
9. dr. Upik A.Miskad,SpPA,Ph,D (Anggota/Penguji)

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Sukmawati Tansil Tan

Nomor mahasiswa : P0200309093

Program studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi 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 disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, November 2012

Yang menyatakan

Sukmawati Tansil Tan

PRAKATA

Segala puji syukur kami panjatkan kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang, atas rahmat, perlindungan, kasih dan kekuatan yang diberikan kepada saya, sehingga saya dapat melakukan semua kegiatan yang berhubungan dengan disertasi ini. Kami juga sangat bersyukur dan ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

- Prof. dr.Syarifuddin Wahid SpPA. Ph.D. SpF. sebagai Promotor, dengan dedikasi yang sangat tinggi dalam membimbing, sediakan waktu untuk memotivasi, memberi semangat, pengertian mengenai hasil penelitian, masukan ide-ide, dan yang tidak dapat dirinci, sampai terlaksananya ujian ini
- Prof Peter Heenan yang dengan senang hati menerima kami di Australia, memberi kesempatan untuk belajar di laboratoriumnya, memberi sampel yang sangat sulit didapat dengan senang, memberi buku dan journal-journal yang berkaitan dengan disertasi KSB, memberikan cara mendiagnosis KSB, membimbing, mengarahkan dan memberi antibodi-antibodi yang digunakan dalam penelitian ini secara gratis
- Miss Raelene yang dengan senang hati membantu melakukan pemeriksaan laboratorium untuk penelitian ini, walaupun sangat sulit dan berulang-ulang dilakukan dengan tekun dan sabar, karena antibodi yang baru pertama kali digunakan untuk jaringan KSB
- Prof. DR. dr. Bambang Sutrisna, MSHc(Epid) sebagai Ko-Promotor, dengan tekun dan sabar membimbing, memberi pengertian hasil penelitian dengan analisis statistik sampai hasil akhir disertasi ini
- dr. Mahmud Ghaznawie, SpPA. Ph.D, sebagai Ko-Promotor. Yang sangat berjasa dalam penelitian ini, dimulai dari, memperkenalkan kami kepada Prof Peter Heenan di Perth Australia, untuk mendapatkan sampel, mendiagnosis, dan melakukan pemeriksaan laboratoium di Australia, menganalisa dll. Juga dengan sabar dan tekun memberi bimbingan, arahan, pengertian sampai selesainya disertasi ini

- Prof.DR.dr. Suryani As'ad, M.Sc, SpGK(K) selaku ketua Program S3 Ilmu Kedokteran sekaligus sebagai tim Penguji, yang selalu dengan sabar dan penuh perhatian dalam memberi arahan, memotivasi, memberi semangat sampai saat ini
- Prof.dr.Irawan Yusuf, PhD selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hassanuddin, sekaligus sebagai tim penguji, yang sudah memberi kesempatan kepada kami untuk mengikuti program S3 di Unhas, selalu memberi semangat dan motivasi sampai selesainya disertasi ini.
- Prof.Dr.dr. Prasetyowati Subchan, SpKK (K) sebagai penguji eksternal, yang selalu membimbing, memberi saran, mengoreksi makalah dengan teliti, dan selalu menyediakan waktu untuk hadir walaupun jauh.
- Prof.Dr.dr.Muh.Dali Amiruddin, SpKK (K) sebagai tim penguji, yang selalu memberi nasehat, saran, mengoreksi dan membimbing sampai selesainya disertasi ini.
- Prof.Dr.dr. F.X. Budhianto Suhadi, MM sebagai tim penguji, yang selalu dengan sabar memberi nasehat, membimbing, mengoreksi, dan memberi saran demi sempurnanya disertasi ini.
- dr. Upik A.Miskad, SpPA, Ph,D sebagai tim penguji dan teman dekat, yang sudah dengan sabar, tekun dan ikhlas bersama DR Husni dalam menilai scoring hasil penelitian berulang kali, dan selalu memberi semangat, motivasi, saran, membimbing sampai saat ini
- Dr. Cahyono SpPA.SpS.PhD sebagai kepala bagian Patologi Anatomi FK.Unhas, yang telah memberi kesempatan kepada kami untuk mengambil sampel-sampel kasus KSB. Juga kepada seluruh residen, teman sejawat Patologi Anatomi (DR.dr Husni, Dr. Dilla, Dr. Berti, dll), dan juga seluruh staff di Laboratorium Patologi Anatomi FK.Unhas yang telah membantu dalam mencari kasus KSB.
- Veli Sugondo yang membantu dalam analisis statistik dengan sabar dan selalu memberi semangat untuk mengerti analisis statistik yang sulit, sehingga dapat dimengerti.

- Seluruh tim pengajar program S3 yang sudah memberi kuliah dari semester pertama dan kedua, sehingga disertasi ini dapat berlanjut sampai sekarang
- Seluruh teman seperjuangan angkatan kedua program S3 di UPH, yang selalu memberi semangat dan motivasi, saran sampai terlaksananya disertasi ini (dr linda Lison, dr Mulyani, dr Harsan, Prijo, dr Yesaya dll
- Seluruh staff pasca sarjana baik di UPH maupun di FK.Unhas yang selalu membantu dalam hal menyelesaikan masalah administrasi, sehingga dapat terlaksana ujian selama ini (Bu Rela, Bu Nur, Bu Idda, Bapak Dahyar dll)
- Seluruh staff dan teman-teman yang sudah sangat banyak membantu selama dalam proses dari awal program S3 sampai selesainya makalah ini (Sary Wardani Harahap, Tati, Yuni, Nur, Partono,Udin, dan yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
- Seluruh teman-teman anggota Perdoski cabang Banten, yang selalu menggantikan tugas saya, selama saya dalam masa proses belajar untuk menyelesaikan disertasi ini.
- Ketua dan staff anggota team Majalah MDVI FK-UI yang banyak membantu dalam hal menerima publikasi makalah saya. Dan tidak lupa terimakasih juga saya kepada DR dr Aida S. SpKK (K) yang sejak awal mendukung saya untuk melanjutkan program S3 ini.
- Dan yang terakhir, yang tersayang, dan yang terpenting dalam hidup saya, kepada kedua orang tua saya, Papa saya yang selalu mendukung dan mendoakan saya supaya sukses dan sehat-sehat selalu, kepada mama saya yang sejak saya kecil, selalu mendampingi saya belajar di setiap subuh, membentuk saya menjadi suka belajar, memberi saya sebuah pepatah yang tidak pernah saya lupakan sampai hari ini: " bahwa belajar itu mudah, dan setiap "kata" itu bernilai seribu emas". Untuk keluarga besar saya, khususnya untuk anak-anak saya yang tercinta, yang selalu memberi semangat, pengertian atas kesibukan selama melaksanakan penelitian ini sampai disertasi ini selesai. Semua ini saya persembahkan untuk kebanggaan keluarga besar saya, dengan harapan

semoga dapat memberi contoh yang baik untuk anak-anak saya dalam menimba ilmu yang selalu berkembang.

- Harapan pribadi saya, semoga hasil penelitian ini dapat untuk dibaktikan sebagai sumbangan kepada masyarakat, melayani pengobatan pasien, membimbing, meningkatkan pengetahuan pasien dan masyarakat. Dan gelar yang saya dapatkan tidak untuk dibanggakan di kepala dan didepan nama, semoga dapat ditanamkan di hati untuk dibaktikan dengan tulus bermartabat dan berkualitas untuk masyarakat. Semoga Tuhan selalu memberkati dan melindungi kita semuanya. Amin

Tangerang, 1 oktober 2012

Sukmawati Tansil Tan

IDENTIFIKASI LOKASI DAN STEM CELL ORIGIN SERTA FAKTOR YANG MEMPENGARUHI LEMAHNYA KEMAMPUAN METASTASIS KARSINOMA SEL BASAL

(Studi analitik menggunakan imunohistokimia BerEP4, LGR6 dan LRIG1)

SUKMAWATI TANSIL TAN

(Pembimbing : Syarifuddin Wahid, Bambang Sutrisna dan Mahmud Ghaznawie)

Lokasi asal Karsinoma Sel Basal (KSB) masih diperdebatkan, apakah berasal dari folikel atau interfolikuler. *Stem cell* asal KSB yang penting untuk memahami karsinogenesis KSB belum jelas karena di kulit terdapat berbagai *stem cells*. Pertanyaan lain, kenapa KSB termasuk *low grade carcinoma* dan jarang metastasis.

Penelitian dilakukan pada 23 kasus KSB dari *Healthscope Cutaneous Pathology Laboratory* Western Australia. Arsip blok paraffin dipotong serial untuk diwarnai *Hematoxylin-Eosin* (HE) dan imunohistokimia (IHK) untuk BerEP4, LGR6 dan LRIG1. BerEP4 digunakan sebagai biomarker diagnosis lesi dini KSB dan identifikasi lokasi asal KSB dimana tumor mulai bertumbuh. Investigasi dilakukan juga untuk identifikasi *stem cell* asal KSB dengan pewarnaan IHK LGR6 dan LRIG1. LGR6 telah dilaporkan sebagai marker untuk *isthmus stem cells* dan LRIG1 untuk *junctional stem cell*. Untuk mengungkapkan kemungkinan peran karsinogenesis kedua marker tersebut, perbedaan ekspresi pada lesi KSB dengan ekspresi pada sel basal normal epidermis telah diteliti juga dengan melihat perbedaan scoring dari intensitas warna dan persentase sel terwarna pada pewarnaan IHK .

Pewarnaan IHK BerEP4 tidak positif untuk sel-sel basal normal tetapi positif kuat pada lesi KSB termasuk lesi KSB yang masih sangat dini (5-15 sel). Jelas terlihat dengan IHK BerEP4, lesi dini KSB muncul pada lapisan basal. Dari 32 kasus KSB ternyata lesi dini KSB tersebar multifokus sebanyak 394 lesi pada lapisan basal interfolikuler (96,4 % lesi) dan pada folikel infundibulum (3,6 %). LGR6 positif pada semua lesi KSB dengan positifitas yang bervariasi yaitu 73.35% positif kuat, 25.63% positif sedang dan hanya 1.02% negatif. LRIG1 positif juga pada semua lesi KSB dengan positifitas yang bervariasi juga yaitu 47.97% positif kuat, 44.92% positif sedang, 0.51% positif lemah dan hanya 6.6% negatif. LGR6 dan LRIG1 ditemukan juga positif tidak merata pada sel-sel basal dan suprabasal normal epidermis. Lesi KSB dini memperlihatkan over ekspresi LGR6 dan LRIG1 yang sangat signifikan dibandingkan dengan ekspresi kedua marker ini pada sel basal normal epidermis ($p=0,000$)

Kesimpulan pertama studi ini adalah pewarnaan IHK BerEP4 berguna untuk deteksi lesi dini KSB. Kedua, lokasi asal pertumbuhan KSB dari seluruh kasus teridentifikasi berada tersebar multifokus pada daerah interfolikuler dari basal epidermis, hanya beberapa kasus yang memiliki juga lesi pada daerah folikel infundibulum. Ketiga, KSB yang muncul pada interfolikuler kemungkinan sebenarnya berasal dari *junctional stem cells* atau *isthmus stem cell* yang mengalami mutasi oleh paparan karsinogen di folikel kemudian bermigrasi ke interfolikuler. Kemungkinan ini diperkuat oleh adanya sebagian dari *stem cell* yang sudah mutasi ini tidak migrasi ke interfolikuler dan berkembang menjadi KSB di folikuler infundibulum. Keempat, karakteristik dari KSB sebagai *low grade carcinoma* dan kemampuan metastasis lemah mungkin disebabkan oleh overekspresi LRIG1 yang berperan sebagai *tumor suppressor* menghambat proliferasi sel-sel KSB.

Key words : Karsinoma Sel Basal, *isthmus stem cells*, *junctional stem cell*, BerEP4, LGR6, LRIG1, and *tumor suppressor*

IDENTIFICATION THE SITE AND STEM-CELL ORIGIN OF BASAL CELL CARCINOMA AND THE POSSIBILITY FACTORS CAUSING ITS LOW CAPACITY TO METASTASIZE

(Analytic study using Immunohistochemistry BerEP4, LGR6 and LRIG1)

SUKMAWATI TANSIL TAN

(supervised by Syarifuddin Wahid, Bambang Sutrisna and Mahmud Ghaznawie)

The site origin of Basal Cell Carcinoma (BCC) is still disputable, whether follicular or interfollicular. Furthermore, the stem cell origin of BCC is not clear yet. The presence of various stem cells in the skin and skin appendages make the study of stem cell origin of BCC is very important to elucidate carcinogenesis of BCC. Another intriguing question about the factors that may influence the biologic behavior of BCC is why they are low grade carcinoma and have low capacity to metastasize. 23 cases of early BCC from Healthscope Cutaneous Pathology Laboratory, Western Australia, were studied. The paraffin blocks were re-cut serial and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and immunohistochemistry (IHC) for BerEP4, LGR6 and LRIG1. BerEP4 was used as a biomarker to diagnose early lesions of BCC and to identify the site origin of BCC where the malignant transformed cells started to grow. We further investigated the stem cell origin of BCC by IHC staining for LGR6 and LRIG1. Both markers have recently been reported as markers for isthmus stem cells and junctional stem cell respectively. To elucidate the role of LGR6 and LRIG1 in the carcinogenesis of BCC we analyzed the different expression of both biomarkers between BCC's cells and normal basal cell of the epidermis, by scoring the IHC staining intensities and percentage of positive cells.

The BerEP4 staining did not stain normal basal cells. However, BerEP4 were strongly positive in every BCC lesions. Even the very early lesions (5-15 cells), budding off from the basal layer can be detected clearly by IHC staining for BerEP4. Using BerEP4 staining the early BCC lesion of the 32 cases we identified multifoci of 394 early lesions in the interfollicular basal layer (96.4%) and infundibulum of the hair follicles (3.6%). LGR6 staining were positive in almost all early BCC lesions at varying grades, consisted of 73.35% strongly positive, 25.63% moderately positive and only 1.02% negative. The LRIG1 were also positive in almost all early BCC lesions at varying intensities, consisted of 47.97% strongly positive, 44.92% moderately positive, and 0.51% weakly positive and 6.6% negative. LGR6 and LRIG1 were also found positive randomly at the basal and suprabasal epidermis. The early BCC lesions showed a significant overexpression of LGR6 and LRIG1 which were detected by immunostaining as compared with their expression in normal basal cell of the epidermis. ($p=0,000$)

The conclusions of the study are as follows. First, IHC staining for BerEP4 is useful for the detection of very small early lesions of BCC. Second, the site origin of early BCC lesions in all cases were identified multifoci in the interfollicular basal cells of the epidermis, and in a small number of cases also have early BCC lesions in the follicular infundibulum. Third, BCC arising in the interfollicular basal cells may actually originate from mutated junctional stem cells or mutated isthmus stem cell that migrated to the interfollicular area. Some of these mutated stem cells may stay in its site of origin and grow as BCC in the follicular infundibulum. Fourth, the characteristic of BCC as low grade carcinoma and low potency to metastasize may be due to the its overexpression of LRIG1 which act as tumor suppressor to prevent proliferation of BCC.

Key words : Basal Cell Carcinoma, isthmus stem cells, junctional stem cell, BerEP4, LGR6, LRIG1, and tumor suppressor

DAFTAR ISI

Halaman judul.....	i
Halaman DISERTASI.....	ii
Halaman Pengesahan.....	iii
Tim Penguji.....	iv
Surat Pernyataan.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi-ix
Abstrak.....	x
<i>Abstract</i>	xi
Daftar isi.....	xii - xxiv
Daftar Singkatan.....	xvii-xviii
Daftar Lampiran.....	xix
Daftar Gambar.....	xx-xxii
Daftar Tabel.....	xxiii-xxiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar belakang Masalah.....	1
B. Masalah penelitian.....	2
B1. Rumusan masalah.....	2
B2. Alasan memilih masalah.....	2
B3. Pertanyaan peneliti.....	3
C. Tujuan penelitian.....	3
C1. Tujuan umum.....	3
C2. Tujuan khusus.....	3

D. Manfaat penelitian.....	4
D1. Bidang pengembangan ilmu dan aplikasi klinik.....	4
D2. Bidang kesehatan masyarakat	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5-53
A. KARSINOMA SEL BASAL.....	6-7
B. Sejarah Penemuan Sel Origin KSB/organolepsis penelitian.....	9-10
C. Etiopatogenesis.....	11-19
a. Faktor Sinar Matahari/ultraviolet.....	11-15
b. Kelainan Hedgehog Pathway.....	15-17
c. Gambar skema Hedgehog pathway.....	17
d. Gambar Skema Alur Signal Sonic Hedgehog Pathway.....	17
e. Skema Etiopatogenesis terjadinya KSB.....	18
f. Keterangan Skema Etiopatogenesis.....	19
D. Morfogenesis kulit dan Stem cell.....	20-28
a. Perubahan arsitektur sel basal.....	21
E. Hubungan epidermal stem cell dengan dermis dan mesenchym kulit.....	28-29
Skema struktur kulit.....	29
F. Stem cell epidermis dan markernya.....	30-36
Struktur folikel rambut.....	31
Ilustrasi fungsi stem cell.....	33
Lokasi stem cell epidermis.....	34
Stem cell melanosit.....	35

Lokasi stem cell isthmus pada junctional zone folikel rambut.....	36
G. LGR6.....	37-39
Lokasi isthmus <i>stem cell</i> pada folikel rambut.....	39
H. LRIG1.....	40-44
a. Skema struktur inhibitor EGFR Epidermal growth factor receptor.....	42
b. Stem cell ekspresi LRIG1	43
I. Marker Stem Sel dengan Pemeriksaan Imunohistokimia untuk KSB.....	45-53
a. Ekspresi P63 pada stem cell epidermis.....	50
b. Mekanisme molekul yang mempengaruhi proliferasi dan diferensiasis epidermis.....	52
c. Skema lokasi dari subpopulasi keratinosit.....	53
BAB III KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP	54-63
A. Kerangka Teori Marker Stem Sel untuk mencari Sel Origin KSB.....	54-57
Skema Pemeriksaan Imunohistokimia yang Positif pada Stem Sel Folikuler dan Interfolikuler.....	58
B. Hipotesis.....	59
C. Kerangka Konsep sel origin KSB.....	60
D. Desain Penelitian.....	61
E. Definisi operasional variabel.....	62-63
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN.....	64-78

A. Desain penelitian.....	64
B. Populasi.....	64
C. Kriteria inklusi.....	65
D. Kriteria eksklusi.....	65
E. Jumlah sample.....	65-66
F. Teknik pengambilan sampling.....	66
G. Cara pengambilan sample.....	67
H. Tempat Penelitian.....	67
I. Kontrol kualitas.....	68
J. Pertimbangan etik.....	69
K. Keterbatasan penelitian	69
L. Bahan, alat, dan penelitian.....	69
M. Waktu penelitian.....	70
N. Prosedur penelitian.....	70
O. Prosedur pemeriksaan HE, BerEP4, LGR6 dan LRIG1.....	74
P. Cara scooring.....	75-78
BAB V. HASIL PENELITIAN.....	79-84
A. Deteksi KSB dini dengan HE dan IHK BerEP4.....	78-80
B. Identifikasi lokasi asal tunas KSB.....	80
C. Identifikasi <i>stem cell</i> origin pada KSB dengan IHK LRIG1 dan LGR6.....	81-83

D. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan KSB sehingga digolongkan <i>low grade carcinoma</i> dan jarang metastasis	83-85
Foto-foto hasil penelitian.....	85-95
BAB VI. PEMBAHASAN	96-113
A. DIAGNOSIS LESI DINI KSB DENGAN IHK BerEP4.....	96-98
B. LOKASI ASAL KSB.....	98-102
C. STEM CELL ASAL KSB.....	102-111
D. KENAPA KSB LOW GRADE DAN JARANG METASTASIS	109-112
E. Kelemahan dalam penelitian ini	112
BAB VII. KESIMPULAN.....	114
Komentar.....	115-116
Saran.....	116
BAB. VIII Daftar kepustakaan	117- 125
Lampiran 1.....	126
Lampiran 2.....	127-155
Riwayat hidup peneliti.....	156-159

DAFTAR ARTI DAN LAMBANG DAN SINGKATAN

AcH4	: <i>Acetylated histone H4</i>
BCC	: <i>Basal Cell Carcinoma</i>
Bcl2	: <i>B-cell Lymphoma 2</i>
BMZ	: <i>Basement Membrane Zone</i>
C3H10T1/2	: <i>pluripotent C3H10T1/2 stem cells</i>
cAMP	: <i>Cyclic AMP</i>
CFE	: <i>Colony-Forming Efficiency</i>
CK	: <i>Cytokeratin</i>
COX	: <i>cyclooxygenase</i>
CP	: <i>Comitted Progenitor</i>
CREB	: <i>cAMP Respon Elemen Binding</i>
DAB	: <i>3, 3'-diaminobenzidine</i>
DNA	: <i>Deoksi Nucletaed Acid</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth factor</i>
Ep-CAM	: <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
EPU	: <i>Epidermal Proliferative unit</i>
FOX	: <i>Forkhead box</i>
gen P53	: <i>Potein 53</i>
HE	: <i>Haematoxyllin Eosin</i>
HP	: <i>Hedgehog Pathway</i>
IHC	: <i>Immunohistochemistry</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
KGF	: <i>Keratinocytes growth Factors</i>
KSB	: <i>Karsinoma sel Basal</i>
KSS	: <i>Karsinoma Sel Skuamosa</i>
LRC	: <i>Label-retaining cells</i>
NER	: <i>nucleotide excision repair</i>
ORS	: <i>Outer Root Sheath</i>
PDGFR α	: <i>platelet-derived growth faktor receptor α</i>
PGE2	: <i>Prostaglandine E2</i>
PTCHI	: <i>Patched Tumor Suppressor</i>
PTEN	: <i>tensin homolog pada kromosom 10</i>

SHH	: <i>sonic hedgehog</i>
SMA	: <i>Smooth Muscle Actin</i>
SmoM2	: <i>Smoothened M2</i>
SOX9	: <i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
src	: <i>Sarcoma</i>
TA	: <i>Transit Amplifying cells</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
UNHAS	: <i>Universitas Hasanuddin</i>
UPH	: <i>Universitas Pelita Harapan</i>
UVA	: <i>Ultraviolet A</i>
UVB	: <i>Ultraviolet B</i>
VCAM	: <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Tabel sejarah penelitian Karsinoma Sel Basal

Lampiran 2 : Hasil analisa statistik

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. KSB tipe nodul ulseratif-berpigmen.....	7
Gambar 2. KSB tipe infiltratif / morfea.....	7
Gambar 3. KSB tipe ulkus Rodens.....	8
Gambar 4. KSB tipe nodul.....	8
Gambar 5. P53 Signaling	16
Gambar 6. Gambar skema Hedgehog pathway.....	16
Gambar 7. Skema Alur Signal Sonic Hedgehog Pathway.....	17
Gambar 8. Etiopatogenesis terjadinya KSB.....	18
Gambar 9. Perubahan arsitektur sel basal.....	21
Gambar 10. Struktur kulit	29
Gambar 11. Struktur folikel rambut.....	31
Gambar 12. Ilustrasi fungsi stem cell.....	33
Gambar 13. Bagian-bagian stem cell epithelial pada kulit.....	34
Gambar 14. Stem cell melanosit	35
Gambar 15. <i>Junctional zone</i> folikel rambut.....	36
Gambar 16. Berbagai stem cell yang menjaga homeostasis kulit	39

Gambar 17. skema struktur inhibitor EFGR (<i>Epidermal growth factor</i> <i>receptor</i>).....	42
Gambar 18. LRIG1 <i>transcription</i>	42
Gambar 19. Ekspresi LRIG1 Pada kultur epidermis.....	43
Gambar 20. Progresif Bulge stem cell.....	44
Gambar 21. Ekspresi p63 pada stem cell epidermis dan sel TA manusia.....	50
gambar 22. Ekspresi p63 dan PCNA oleh stem sel keratinosit dan sel-sel TA	50
Gambar 23. Heterogenitas dalam lapisan epidermis.....	52
Gambar 24. Mekanisme molekul yang menkontrol proliferasi dan diferensiasi epidermis di kulit Skematis lokasi dari subpopulasi keratinosit pada manusia dan epidermis tikus.....	52
Gambar 25. Skematis lokasi dari subpopulasi keratinosit pada manusia dan epidermis tikus.....	53
Gambar 26. Pemeriksaan imunohistokimia yang positif pada stem cell folikuler dan interfolikuler.....	58
Gambar 27. Kerangka konsep sel origin dan stem cell KSB.....	60
Gambar 28. Desain penelitian.....	561

Gambar 29 : Microscope Olympus FX XP 10.....	72
Gambar 30. Prosedur pemeriksaan HE dan AB LGR6,LRIG1 dan BerEP4.....	74
Gambar 31-32. Cara penilaian basal kulit normal.....	78
Gambar 33. Ilustrasi overlapping hasil pewarnaan positif antibodi pada sitoplasma.....	112
Gambar 34. Ilustrasi proliferasi asimetri dari sel epidermis pada KSB.....	113

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jumlah lesi KSB diidentifikasi berdasarkan lokasi asal, jumlah sel per lesi dan pembentukan nodul berdasarkan pewarnaan BerEP4.....	81
Tabel 2. Overekspresi LGR6 dan LRIG1 pada lesi BCC (n=394) dibandingkan dengan ekspresi kedua sel pada sel basal normal epidermis dengan pewarnaan imunohistokimia.....	84
Tabel 3. <i>Mann-whitney U test</i> LGR6 dan LRIG1 pada sel-sel Basal normal dengan Lesi KSB.....	84
Tabel 4. Deskripsi kasus-kasus KSB	127
Tabel 5. Deskripsi Demografi Pasien dan Karakteristik KSB.....	127
Tabel 6. Histogenesis : persentase jumlah KSB pada basal dan basal/folikel.....	128
Tabel 7. Gambaran bentuk basal dan folikel dengan pewarnaan BerEP4.....	128
Tabel 8. Hubungan antara intensitas warna pada pewarnaan LGR6 dengan kontrol.....	129
Tabel 9. Uji Chi ² perbedaan intensitas warna dengan antibodi LGR6 pada lesi KSB oleh kedua observer	129
Tabel 10. <i>Two sample test with equal variances</i>	130
Tabel 11. Uji T test persentase positif antibodi LGR6 pada KSB dan kontrol penilaian oleh dua observer	130

Tabel 12. Korelasi antara lesi KSB dan basal, LRIG1 Lesi dan basal antara dua Observer.....	131
Tabel 13. Uji Chi2 perbedaan intensitas warna LGR6 lesi KSB pada kelompok KSB dan kontrol oleh kedua observer	131
Tabel 14. Uji T test persentase positif antibodi LGR6 dan LRIG1 pada KSB dan kontrol penilaian oleh dua observer	132
Tabel 15. Distribusi persentase intensitas warna sel-sel KSB dan sel-sel basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua observer.....	133
Tabel 16. Diagnostic interobserver agreement.....	133
Tabel 17. Distribusi Persentase sel-sel KSB dan Basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1, diperiksa oleh Observer pertama.....	135
Tabel 18. Distribusi Persentase sel-sel KSB dan Basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1, diperiksa oleh Observer kedua	135
Tabel 19. Distribusi Total Score Intensitas Warna dan Persentase sel-sel KSB yang terwarnai oleh antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua observer.....	136
Tabel 20. Distribusi Kategori Ekspresi Total Score Intensitas Warna dan Persentase sel-sel KSB yang terwarnai antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua observer.....	137

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Kanker kulit secara umum dibagi menjadi kanker kulit melanoma dan non melanoma, yang termasuk kanker kulit non melanoma adalah Karsinoma Sel Basal dan Karsinoma Sel Skuamos. Karsinoma sel Basal (KSB) disebut juga Basalioma, epitelioma sel basal, ulkus Rodent dan ulkus Jacob (Jacob 1824; Rubin 2005). KSB merupakan penyakit kanker kulit yang terbanyak dijumpai, berkisar 75- 80% dari kanker non melanoma. Di Amerika Serikat KSB semakin meningkat, dari 65% pada tahun 1980 menjadi 80% dari Karsinoma kulit non melanoma pada tahun 2010. (Panda 2010).

Yang menarik dari penyakit KSB ini adalah walaupun sudah banyak dilakukan penelitian, namun sampai saat ini asal dari sel origin KSB masih kontroversi, dan penyebab dari sifat jarang metastasis KSB belum diketahui. KSB pada awalnya dianggap berasal dari lapisan sel basal epidermis (Sellheyer 2011). Pada hasil penelitian lebih lanjut, KSB diduga berasal dari folikel rambut karena berdasarkan gambaran morfologi dan sitokeratin sel-sel KSB yang mirip dengan folikel rambut (Lever 1948). Pemeriksaan dengan marker *stem cell*, ternyata ditemukan KSB bukan hanya dari folikuler tapi juga dari interfolikuler epidermis, sehingga perlu dilakukan eksplorasi lebih lanjut (Krahl and Sellheyer 2010).

B. Masalah penelitian

B1. Rumusan masalah

1. Lokasi asal (*site of origin*) KSB masih kontraversi antara folikel dan interfolikuler.
2. *Stem cell* asal KSB masih kontraversi
3. Penyebab *low grade carcinoma* dan jarang metastasis dari KSB belum diketahui

B2. Alasan memilih masalah penelitian

1. Lokasi asal dimana KSB mulai bertumbuh perlu dipastikan untuk penemuan KSB dini.
2. *Stem cell* asal KSB perlu diketahui untuk lebih memahami proses karsinogenesis KSB yang dapat menjadi pedoman penanganan klinis KSB.
3. Penyebab KSB memiliki sifat jarang metastasis dibanding kanker kulit yang lain perlu diketahui untuk mengkaji kemungkinan dapatnya penyebab itu digunakan untuk mengurangi keganasan tumor-tumor yang *high grade carcinoma*.
4. Umumnya peneliti melakukan penelitian pada tumor yang sudah stadium lanjut, sehingga perbedaannya dengan sel-sel basal normal sudah berbeda, dengan meneliti KSB dini dapat lebih nyata proses karsinogenesis KSB.

B3. Pertanyaan Peneliti

1. Apakah lokasi asal KSB dari sel interfolikular atau folikular?
2. Apakah KSB berasal dari *isthmus stem cell* atau *junctional stem cells*.
Pada *Outer Root Sheath* (ORS) folikel rambut?
3. Faktor apa yang mempengaruhi sel KSB sehingga digolongkan dalam *low grade carcinoma* dan jarang metastasis?

C. Tujuan Penelitian

C1. Tujuan Umum

1. Menemukan lokasi asal (site of origin) KSB
2. Menemukan *stem cell* yang mengalami mutasi menjadi sel KSB
3. Menemukan penyebab KSB memiliki sifat *low grade carcinoma* dan jarang metastasis
4. Menambah informasi tentang etiopatogenesis dari KSB

C2. Tujuan Khusus

1. Mengidentifikasi lokasi asal pada lesi KSB dini menggunakan teknik pewarnaan IHC dengan BerEP4
2. Mengidentifikasi ekspresi LGR6 sebagai biomarker *isthmus stem cell* dan LRIG1 sebagai biomarker *junctional stem cells* pada lesi KSB
3. Membandingkan ekspresi kedua *biomarkers* (LGR6 dan LRIG1) pada lesi KSB dengan pada sel basal epidermis normal dari kulit yang sama

D. Manfaat

D.1. Bidang pengembangan ilmu dan aplikasi klinik.

1. Memberikan informasi tentang kegunaan pewarnaan IHC dengan BerEP4 untuk diagnose dini KSB pada pemeriksaan histopatologis.
2. Memberikan informasi tentang lokasi asal dan stem cells asal KSB yang dapat digunakan sebagai rujukan penelitian. tentang KSB serta untuk kepentingan diagnose, pengobatan dan perkiraan prognosis KSB.
3. Menambah informasi tentang etiopatogenesis KSB, khususnya berkaitan dengan sifat KSB yang pada umumnya merupakan *low grade carcinoma* dengan kemampuan metastasis yang rendah yang dapat digunakan untuk merancang suatu strategi pengobatan kanker yang memiliki sifat *high grade carcinoma*.

D.2. Bidang kesehatan masyarakat

1. Masyarakat dapat memperoleh informasi yang mutakhir tentang lokasi asal kejadian KSB dan karakteristik perkembangannya untuk kepentingan diagnose dini KSB sebelum menjadi KSB lanjut dengan prognosis yang lebih jelek.
2. Memberikan informasi penderita KSB tentang faktor yang mempenaruhi prognosis penyakit yang dideritanya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II A. KARSINOMA SEL BASAL

Di Indonesia menurut data Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia tahun 1989, dari 1530 kasus kanker kulit, yang terbanyak adalah kasus karsinoma sel basal yaitu 39,93% (Tjarta 1995). Diperkirakan setiap tahun sebanyak 900.000 – 1 juta orang (550.000 laki-laki dan 350.000 wanita), didiagnosis menderita KSB di Amerika Serikat. Resiko terkena KSB semasa hidup pada populasi kulit kaukasia adalah 33-39% untuk laki-laki dan 23-28% untuk wanita (Bader, L et al. 2009). Perbandingan laki-laki dan perempuan adalah 2,1 : 1, laporan terakhir menunjukkan peningkatan jumlah penderita perempuan sehingga rasio laki-laki banding perempuan menjadi 3:2 (Ramsey 2010). Kasus yang terbanyak di dunia adalah di Australia yang mencapai 2% dari populasi penduduknya atau sekitar 650-1560 kasus per 100.000 populasi (Levi, Randimbison et al. 1997) dan kasus-kasus KSB terus meningkat yang diperkirakan sebanyak 2 kali lipat setiap 25 tahun (Ramsey 2010).

Usia penderita KSB berkisar antara 50 – 80 tahun, rata-rata sekitar 55 tahun. Pada beberapa penelitian epidemiologi ditemukan hanya 1-3% dari jumlah KSB yang menderita pada usia dibawah 35 tahun (Bergman, Contard et al. 2005) terutama pada pasien dengan sindrom nevoid KSB berpotensi menderita KSB pada usia muda (Barankin, G et al. 2009),

Fabio menemukan KSB pada usia muda ada hubungannya dengan limfoma non-Hodgkins's (Levi, Randimbison et al. 1997).

Lokasi anatomis lesi KSB paling sering di 1/3 tubuh bagian atas dimana 75-80% pada daerah muka, lesi di muka paling sering berada di hidung daerah nasal tip dan alae (Levi, Randimbison et al. 1997; Santacroce, Diomedee et al. 2008), Sekitar 25% KSB berada pada daerah badan, Sisanya 5% berada di daerah penis, vulva, dan perianal (Bader, L et al. 2009), yang diduga berhubungan dengan fusi *embryonic planes* (Barankin, G et al. 2009). KSB bersifat sangat destruktif, dapat merusak jaringan kulit, tulang rawan bahkan sampai tulang di sekitarnya dan menimbulkan cacat pada wajah (Puri, Gunabushanam et al. 2006; Ramsey 2010).

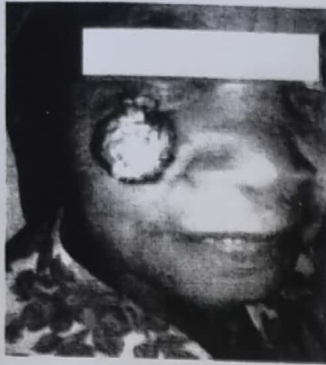
KSB jarang menimbulkan metastasis (hanya 0,028-0,55%), pernah dilaporkan KSB bermetastasis ke kelenjar getah bening, paru-paru dan tulang (Levi, Randimbison et al. 1997; Bader, L et al. 2009; Sajjiadian, Barakat et al. 2010). Bagaimana mekanisme KSB menginvasi kedalam jaringan stroma dan jarang metastasis masih belum diketahui (Markey, Lane et al. 1992), pernah diduga berhubungan dengan ekspresi kadar aktin (Uzquiano, Prieto et al. 2008).

Gambaran klinis KSB dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu tipe nodul, infiltratif/morfea, ulkus Rodens, superfisial, *basosquamous carcinoma*, dan *recurrent basal cell carcinoma* (BCC) (gambar 1,2,3,4) (Goldberg LH 1996). Secara histopatologis KSB (BCC) dibagi menjadi dua pembagian besar yaitu: *undifferentiated BCC* dan *differentiated BCC*. *Undifferentiated BCC* terdiri atas

berbagai variasi pertumbuhan, ada yang tumbuh indolen seperti *superficial BCC*, *nodular BCC* dan *micronodular BCC*, ada pula yang tumbuh agresif seperti *infiltrative BCC*, *metatypical BCC* (*basosquamous carcinoma*), *morpheiform BCC* (*sclerosing BCC*). *Differentiated BCC* seperti *keratotic BCC*, *infundibulocystic BCC*, *follicular BCC*, *Pleomorphic BCC*, *BCC with sweat duct differentiation*, *BCC with sebaceous differentiation*, *fibroepithelioma of Pinkus* dan *recurrent BCC*. (Crowson 2006).

Terapi KSB sampai saat ini adalah dengan eksisi, medikasi, kuretase, krioterapi dan radiasi (Ramsey 2010; Ray, Basu et al. 2010). Perlu dilakukan pencegahan dan diagnosis dini KSB untuk mencegah kerusakan kulit berlanjut yang akan merusak anatomi dan fungsi dari organ yang terkena KSB. Dengan cara menemukan sel origin, *stem cell*, dan marker yang khusus untuk mendeteksi dini KSB, penyebab metastasis KSB, diharapkan kasus-kasus KSB dapat dicegah sejak awal.

GAMBARAN KLINIS : JENIS-JENIS TIPE KARSINOMA SEL BASAL



Gambar 1. KSB tipe nodul ulseratif-berpigmen

Nodul dengan ukuran 5x5cm, terletak di bawah palpebra dextra, dengan pinggir lesi meninggi, berbatas tegas, tepi lesi indurasi, mengkilap, sebagian berpigmen. Ulserasi pada bagian tengah dengan krusta tebal.

Sumber: Foto pasien pribadi Sukma



Gambar 2. KSB tipe infiltratif / morfea

Kelainan kulit pada cuping hidung sebelah kiri yang meluas ke daerah ujung hidung dan batang hidung. Kulit berwarna eritem indurasi licin, sklerosis, batas tidak jelas, dengan dekstruksi di cuping hidung. Tanpa tanda-tanda radang

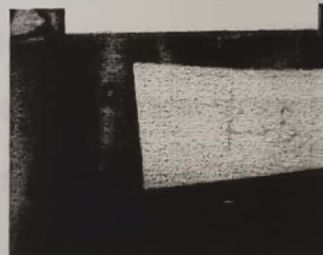
Sumber: Foto pasien pribadi Sukma



Gambar 3. KSB tipe ulkus Rodens

Lesi pada dahi ulkus destruktif, pinggir lesi mengulung berwarna hitam, mudah berdarah

Sumber: Foto pasien pribadi Sukma



Gambar 4. KSB tipe nodul

Nodul pada tengah batang hidung, 4x4 mm, mengkilap, telangiektasi pada tepi lesi. Pada perabaan keras seperti mutiara.

Sumber: Foto pasien pribadi Sukma

II.B. SEJARAH PENELITIAN SEL ORIGIN KSB

Sejarah penelitian KSB yang bertujuan untuk menemukan sel origin KSB diawali dengan pemeriksaan jaringan secara histopatologis dan didukung oleh alat mikroskop elektron. Sekarang banyak dilakukan pemeriksaan dengan pemeriksaan imunohistokimia, namun yang menarik adalah bahwa hasil-hasil yang didapat sampai sekarang masih kontroversi. Sejarah penemuan dan penelitian mengenai sel origin KSB dapat digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok pertama: yang mendukung sel origin KSB berada pada interfolikuler, Krompecher E pada tahun 1903 menyimpulkan bahwa sel origin KSB berada pada lapisan sel basal interfolikuler epidermis, Geschicker pada 1935 menduga KSB berasal dari sel basal yang berpotensi berkembang menjadi sel glanduler (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999), pendapat ini didukung oleh penelitian Zackheim pada tahun 1963 (Sellheyer 2011). Kelompok kedua: yang mendukung sel origin KSB berada pada folikel rambut, oleh Lever pada tahun 1948 berpendapat bahwa sel origin KSB berasal dari epitel primer germ rambut (*primary epithelial hair germ*) yang berdiferensiasi tidak lengkap (Sellheyer 2011), dan didukung oleh penelitian Ackerman yang menyatakan bahwa sel origin KSB berasal dari sel-sel *germinativum follikuler* (*follicular germinative cells*) di daerah sel folikel rambut terminal ORS (Asada, Schaart et al. 1992; Ackerman, P.A et al. 1993; Sellheyer 2011), namun Kruger K pada tahun 1999, justru menyimpulkan bahwa sel KSB berasal dari ORS sel rambut Velus (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999). Penemuan terbaru oleh Sellheyer (2010) dengan marker folikuler ORS, mendukung

pembuktian kemiripan antara *germinativum embrionik rambut* (*embryonic hair germ*) dengan KSB (Sellheyer 2011). Kelompok ketiga : yang berbeda dengan pendapat 1 dan 2. Foot NC (1974) menyatakan bahwa KSB berasal dari matriks rambut atau primordial adneksa dermal dan Wallace Halper (1950) berpendapat bahwa KSB berasal dari *germinativum embrionik sel epitel* (*embryonic primary epithelial germ cell*) atau dari folikel rambut (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999), sedangkan Pincus menganggap sel origin KSB berasal dari sel pluripoten (Pinkus and Kurtin 1985). (lampiran 1)

II.C. ETIOPATOGENESIS

Etiopatogenesis KSB berhubungan dengan faktor genetik, lingkungan dan paling sering dipicu oleh paparan sinar matahari (Tilli, Steensel et al. 2005; Cohen, Schulze et al. 2006; Arbiser 2009), terutama sinar Ultraviolet B (UVB) yang bergelombang 290 – 320 nm (Sajjiadian, Barakat et al. 2010).

Faktor genetik yang berperan pada KSB terdapat pada kromosom 1 dan satu varian dari setiap kromosom 5, 7, 9, dan 12. Varian tersebut tidak diketahui berhubungan dengan warna rambut, mata, dan warna kulit, tetapi diketahui berhubungan dengan ketidakmampuan memproteksi terhadap paparan sinar matahari, yang mungkin berhubungan dengan faktor resiko tambahan terhadap paparan sinar matahari yang bersifat heterozigot, sedangkan pada kelainan genetik yang bersifat homozigot terutama berhubungan dengan pengaturan

sonic hedgehog pathway signaling (SHH) dan paling sering terjadi pada sindroma nevoid KSB atau sindroma Gorlin (Bader, L et al. 2009; Muzio 2002).

Faktor lingkungan yang sudah diketahui dapat memicu terjadinya KSB adalah hidrokarbon, arsenik, coal Tar, obat topikal *methoxypsoralen*, dan yang paling penting adalah sinar ultraviolet (Tilli, Steensel et al. 2005; Cohen, Schulze et al. 2006; Arbiser 2009). Didapatkan juga bahwa rangsangan onkogen, luka kronis dan trauma akut, terbukti dapat juga sebagai faktor pemicu timbulnya tumor di kulit, memicu pertumbuhan keratinosit menjadi lesi seperti KSB dari bulge folikel rambut tumbuh kearah epidermis, sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan antara luka di epidermis dengan resiko timbul kanker kulit, walaupun mekanisme belum diketahui dengan pasti (Kasper, Jaks et al. 2010).

Faktor sinar matahari / Ultraviolet :

Efek radiasi sinar ultraviolet terhadap kulit dapat bersifat akut dan kronik (Soter 1990; Matsumura and Ananthaswamy 2002). Youn JI dkk membuktikan kerusakan oksidatif akibat sinar ultraviolet terjadi pada saat hipoksia jaringan menginduksi pembentukan *sunburn cell* dan edema kulit (Youn, Gange et al. 1988).

Secara klinis efek akut dari radiasi ultraviolet adalah *sunburn inflammation*, eritem, nyeri, panas, *tanning* sintesis melanin, immunosupresif lokal dan sistemik (Soter 1990; Rass and Reichrath 2008). Sedangkan kerusakan DNA terjadi oleh pembentukan 4-6 *photoproducts* seperti *cyclobutane pyrimidine dimmers*, dan

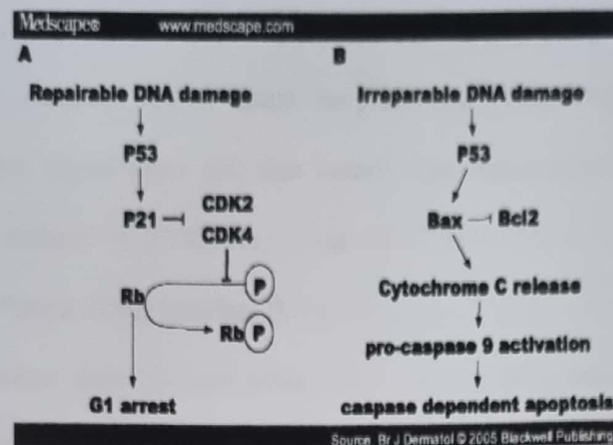
kerusakan DNA akan diperbaiki dengan *nucleotide excision repair* (NER) (Youn, Gange et al. 1988; Rass and Reichrath 2008). Jika *DNA repair* berlangsung baik maka tidak akan terjadi mutasi, tapi jika *DNA repair* gagal dan sel bersangkutan tetap hidup oleh karena gagalnya pula mekanisme apoptosis. Jika *DNA damage* gagal diperbaiki maka akan terjadi kerusakan DNA yang menetap yang berarti telah terjadi mutasi dari gen bersangkutan. Sebenarnya, radiasi UV-B meningkatkan juga apoptosis keratinosit untuk membunuh sel yang kerusakan DNANYA gagal diperbaiki terutama pada daerah yang aktif mengalami proliferasi pada lapisan basal epidermis, sehingga kejadian mutasi oleh radiasi UV-B tidaklah mudah terjadi (Qin, Chaturvedi et al. 2002; Dallaglio, Marconi et al. 2012). Jika mutasi ini mengenai gen yang menyandi sintesis faktor pertumbuhan (protoonkogen) atau yang menyandi sintesis faktor penghambat pertumbuhan (tumor suppressor gene) maka carcinogenesis sudah berlangsung.

Efek kronik dari sinar ultraviolet yang secara kronik yang mengenai *stem cell* pada kulit menyebabkan *photoaging*, imunosupresi, dan yang penting adalah fotokarsinogen. Fotokarsinogen melibatkan pembentukan fotoproduk yang menimbulkan kerusakan DNA, jika *DNA repair* gagal maka akan terjadi mutasi protoonkogen menjadi onkogen atau inaktivasi *tumor suppressor gene*. Akumulasi mutasi akibat fotokarsinogen termasuk *genetic deletion* yang menyebabkan tidak adanya atau tidak aktifnya *tumor suppressor gene* yang menyandi pembentukan protein penghambat proliferasi sel (Gruijl, Kranen et al. 2001). Akumulasi mutasi gen demi gen ini yang berperan dalam memicu atau menghambat proliferasi sel

dan menekan apoptosis akan mengantar untuk terjadinya KSB. Akumulasi mutasi terjadi pada *stem cell / progenitor* sehingga mengalami transformasi menjadi sel-sel ganas (Murphy and Elder 1991; Mimeault and Batra.2010; Couvé, Bouadjar et al. 2002). Mutasi selanjutnya berkaitan dengan terganggunya modulasi sistem imun sehingga sel-sel KSB berhasil lolos dari eliminasi oleh sistem imun (Matsumura and Ananthaswamy 2002) Pada paparan sinar ultraviolet kronik juga terjadi inflamasi akibat stres oksidatif dan *telomere attrition* yang dapat menyebabkan kerusakan DNA yang parah dan ketidakstabilan genomik pada *skin-resident adult stem/progenitor cell*. Inflamasi kronis dapat menyebabkan gangguan pada pengaturan penggantian sel-sel baru dengan menginaktifkan faktor supresi tumor, yang memicu timbulnya pertumbuhan tidak terkendali dan menghambat proses apoptosis. Inaktifasi *tumor supressor gene* yang utama adalah mutasi ekspresi gen p53 yang dikenal dengan nama *signature mutation* yang sangat menentukan dalam terjadinya (Soehnge, Ouhtit et al. 1997; Matsumura and Ananthaswamy 2002)

Penelitian Zhang dkk pada tahun 2005, pada tikus menemukan bahwa ekspresi survivin suatu molekul antiapoptosis yang berlebihan yang terdapat dalam sel basal epidermis untuk proteksi sel terhadap UVB akan memicu antiapoptosis, menyebabkan pembentukan klon-klon baru dari sel yang mengalami mutasi dan memicu terjadinya keganasan termasuk KSB (Zhang, Remenyik et al. 2001; Chao, Eck et al. 2008), Sebagai awal proses karsinogenesis, sel yang mengalami mutasi akan menjadi klon yang selanjutnya berkembang menjadi sel kanker.

(Zhang, Remenyik et al. 2001). Penelitian lain membuktikan bahwa sel yang rusak akibat radiasi atau radikal bebas akibat *stress oksidative* dapat menyebabkan timbulnya klon mutan misalnya klon sel dengan mutan p53 yang berbeda dengan sel sekitarnya yang tanpa mutasi (El-Abaseri, Fuhrman et al. 2005; Aberdam 2008; Chao, Eck et al. 2008). Paparan kronis UVB selama 3-5 minggu atau selama lebih dari 12 jam secara terus menerus mengenai sel basal keratinosit dapat merusak gen p53 dan menginduksi mutasi P53 sehingga tidak terjadi apoptosis dan menyebabkan timbulnya kanker kulit (Chao, Eck et al. 2008). Mutasi p53 juga diketahui sebagai salah satu pemicu terjadinya KSB (Prakoeswa 1990; Bader, L et al. 2009), di mana mutan p53 mengaktifkan src melalui aktivasi *PGE2-prostanoid signaling*, melibatkan cyclooxygenase (COX). COX-1 dan COX-2 mengatur Prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 mengikat satu dari empat reseptor rostanoid. PGE2 yang terikat pada reseptor prostanoid mengaktifkan src, suatu *pro-proliferatif pathway* dan *Cyclic AMP (cAMP)/cAMP*, Respon Elemen Binding (CREB), suatu *proliferative pathway*. Pada penelitian terbaru menemukan bahwa PGE2 mempengaruhi proses terjadinya karsinogenesis pada kulit (Venza, Giordano et al. 2001; Arbiser 2009; Sajjiadian, Barakat et al. 2010). (lihat gambar 5)



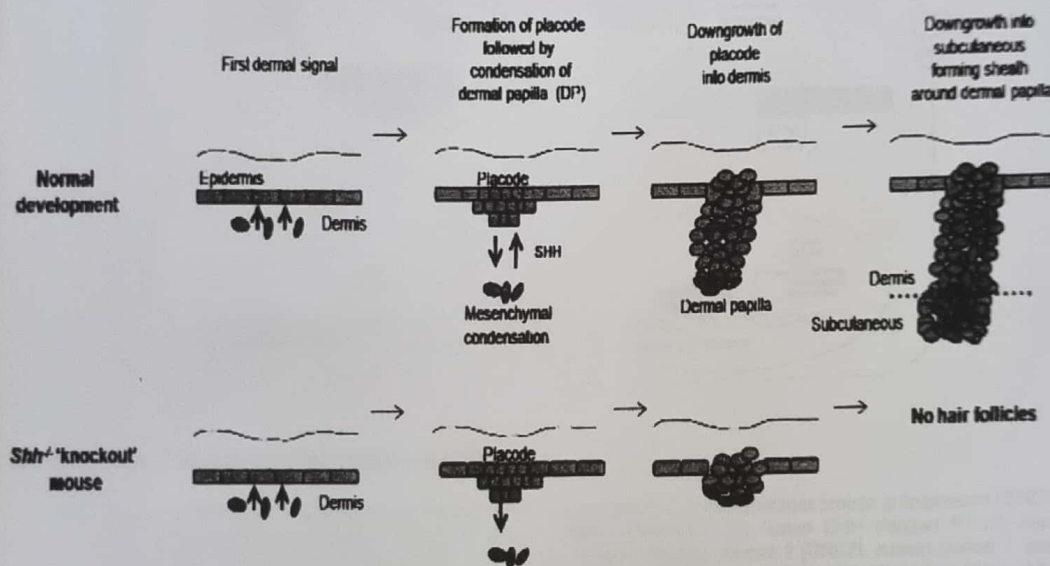
Keterangan gambar 5. *p53 signaling*. Kerusakan DNA menginduksi stabilisasi p53. Jika bisa diperbaiki (A), p53 memicu p21. Ini kemudian menghambat enzim kinase yang *cyclin-dependent*. Akibatnya, Rb tetap tidak terfosforilasi dan menghambat sel pada fase G1. Jika kerusakan DNA tidak bisa diperbaiki (B), p53 juga menginduksi Bax yang kemudian berkompetisi dengan Bcl2 dalam membrane mitokondria. Akibatnya, mitokondria melepas sitokrom C yang memicu kaskade *caspase* dan berakhir dengan apoptosis. (dikutip sesuai aslinya dari: Br J Dermatol, 152(6), 2005)

Kelainan pada Hedgehog Pathway (HP):

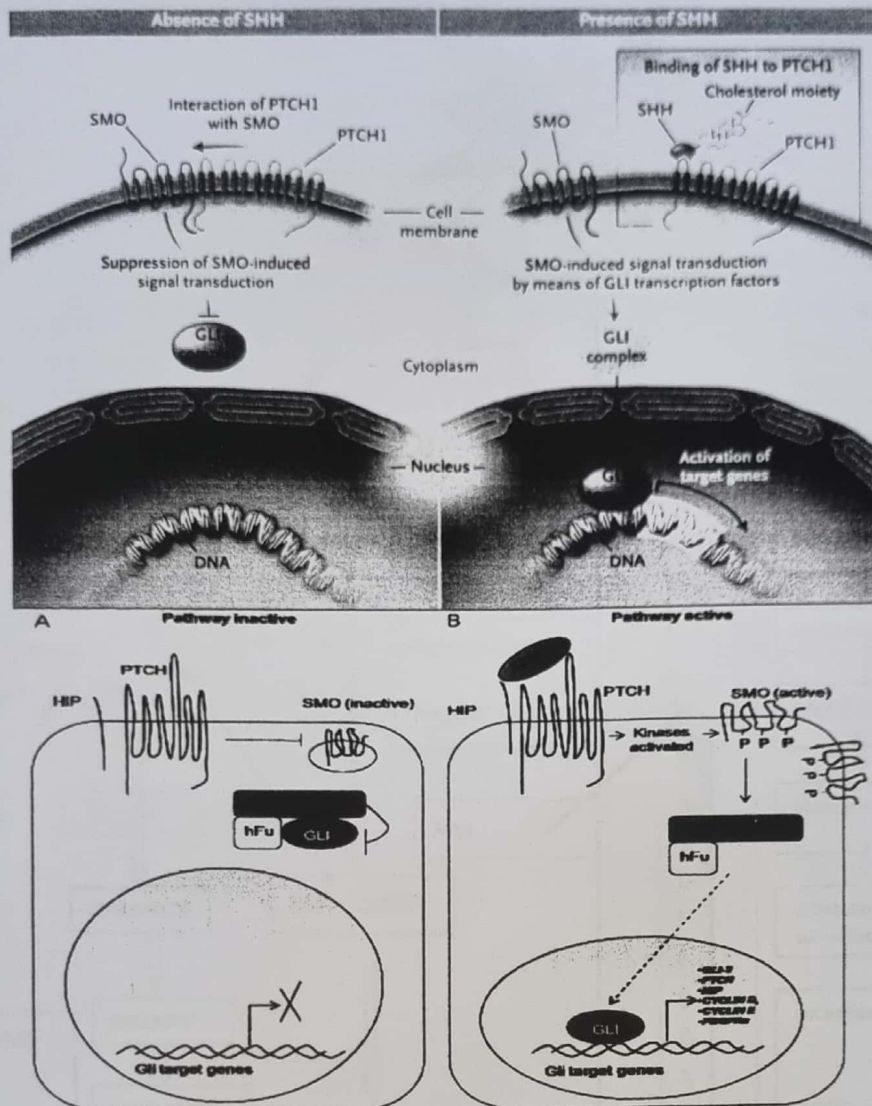
HP aktif pada perkembangan fetus dan akan berhenti bila jaringan sudah dewasa. Rudin mengatakan pada kasus-kasus karsinoma terjadi pengaktifan HP kembali, hal ini juga terjadi pada kasus-kasus KSB (Tang, Xiao et al. 2010). Gangguan regulasi pada *patch signal transduction pathway* mungkin berperan pada etiopatogenesis KSB, di mana *pathway* ini esensial dalam perkembangan folikel rambut embrionik dan selama siklus pertumbuhan rambut (Donovan 2009; Youssef, Keymeulen et al. 2010). Mutasi pada *sonic Hedgehog* (SHH) (Teh, Wong et al. 2002) dan aktivasi PTCH1 dan protein *Forkhead box* (FOX) memegang peranan penting dalam mengekspresi gen yang melibatkan pertumbuhan sel, proliferasi, diferensiasi, *longevity*, dan transformasi. Aktivasi SHH memicu

timbulnya KSB, di mana *Fox* downstream *shh* signaling target glioma transcription faktor 1, yang memicu mRNA untuk berproliferasi (Teh, Wong et al. 2002), memberi aktivasi signal pada Gli, dan selanjutnya mengaktifasi *platelet-derived growth faktor receptor α* (PDGFR α) pada sel C3H10T1/2 yang memicu terjadi proliferasi sel (Panda 2010) (gambar 6, 7a, 7b)

Penelitian oleh Youssef pada folikel rambut tikus dengan mengaktifasi *Hedgehog signaling pathway*, *SmoM2* bulge stem cell folikel rambut, tidak menginduksi terjadinya KSB (Panda 2010) dan ditemukan bahwa KSB timbul dari *long-term resident progenitor* dari interfollikel epidermis dan bagian atas infundibulum, yang mempunyai stem sel resident yang berbeda. (Requena, Farina et al. 1999; Panda 2010; Youssef, Keymeulen et al. 2010).



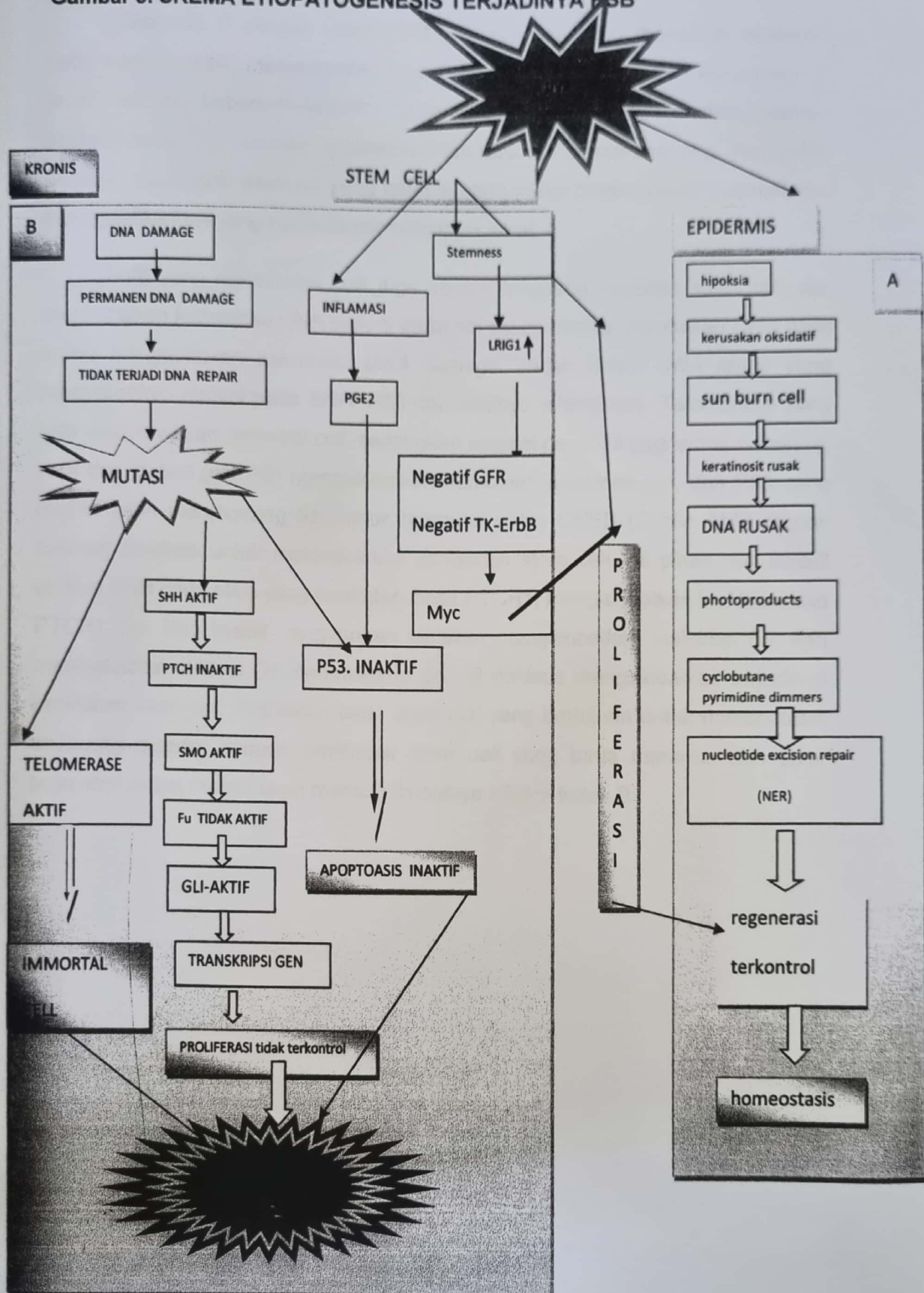
Gambar 6. Gambar skema Hedgehog pathway. *Sonic hedgehog* (SHH) dibutuhkan oleh folikel rambut selama embriogenesisnya. Pembentukan folikel rambut dimulai jika ada signal dari dermis (signal dermis pertama) yang memicu sel epidermis berkumpul membentuk *placode*. Kemudian *placode* mengirim signal balik ke dermis yang mengstimulasi kondensasi sel mesekhimal berkondensasi membentuk papilla dermis. Sebagai response terhadap signal dermis kedua oleh SHH, sel *placode* mulai masuk ke dermis yang akhirnya membentuk selubung yang mengitari papilla dermis. Pada mencit *SHH knockout*, *placode* epidermis dan kondensasi dermis tetap terbentuk, namun pertumbuhan folikel rambut terhambat. (dikutip sesuai aslinya dari Donovan review article Dermatol Surg 2009)



Gambar 7a,b. Alur signal Sonic hedgehog (SHH).

- (A) Jika ligan SHH tidak ada, *patched the transmembrane receptor* (PTCH) menghambat protein *smoothened* (SMO). SMO yang inaktif kemungkinan berada di dalam vesikel intraseluler. (B) Ikatan SHH dengan PTCH akan mengaktifkan berbagai kinase intraseluler, a.l. *G-protein coupled receptor kinase 2* (GRK2), *casein kinase 1*, dan *protein kinase A*. Kumpulan enzim kinase akan memfosforilasi SMO, sehingga terjadi akumulasi SMO yang terfosforilasi pada permukaan sel dan melepaskan hambatan SMO. Keadaan ini akan diiringi dengan translokasi faktor transkripsi GLI dari sitoplasma ke inti, yang pada gilirannya mengaktifkan transkripsi gen target seperti ditunjukkan di atas. Protein sitoplasma yang disebut (*hFu*) dan suppressornya (*SuFu*) kemudian akan berikatan dengan faktor transkripsi GLI, dan berefek positif atau negatif terhadap GLI. Aktivasi SMO akan membebaskan protein GLI dari regulasi negatif *SuFu*. *Hedgehog interacting protein* (HIP) merupakan glikoprotein transmembran yang dapat berikatan dan menghambat SHH, sehingga alur signal SHH terhenti. 35: (dikutip sesuai aslinya dari Donovan review article Dermatol Surg 2009)

Gambar 8. SKEMA ETIOPATOGENESIS TERJADINYA KSB



KETERANGAN GAMBAR 8 : SKEMA ETIOPATOGENESIS TERJADINYA KSB

Ultraviolet B dengan gelombang 290-320 nm, yang mengenai epidermis pada saat hipoksia, menyebabkan terjadi kerusakan oksidatif dan kerusakan sel keratinosit, lalu terbentuk *sunburn cell* dengan kerusakan DNA dan menghasilkan *photoproducts cyclobutane pyrimidine dimmers* yang merangsang *Nucleotide excision repair* pada stem sel yang terletak pada folikel rambut untuk berproliferasi menggantikan sel yang rusak (homeostasis) → kotak A

UVB yang menembus kulit juga secara langsung merusak stem cell, dan menimbulkan kerusakan DNA seperti pada sel-sel epidermis, kerusakan DNA yang kronis menyebabkan *permanen DNA damage*, tidak terjadi *DNA repair* yang menyebabkan mutasi pada SHH, P53 dan aktifnya telomerase. Telomerase yang aktif menyebabkan *immortal cell*, sedangkan ekspresi gen P53 (*signature mutation*), aktif dan mutasi gen P53 mengakibatkan hambatan apoptosis sel, dan P53 yang mutasi akan merangsang Src untuk memulai siklus CREB (*Cyclic AMP respon Elemen Binding*) untuk meningkatkan proliferasi stem cell. Di pihak lain terjadi aktivasi SHH pada MSo yang berikatan pada PTCH1, mengakibatkan inaktivasi dari PTCH1 dan Mso inaktif, rangsangan ini akan mengakibatkan inaktivasi Fu, dan meningkatkan aktivasi Gli mentranskrip gen di nukleus mengakibatkan terjadinya proliferasi stem cell. Proliferasi pada stem cell yang bertujuan untuk homeostasis epidermis disertai dengan proliferasi stem cell yang terus menerus dan tidak terkontrol akibat mutasi akan memicu timbulnya KSB → kotak B

II.D. MORFOGENESIS KULIT DAN *STEM CELLS*

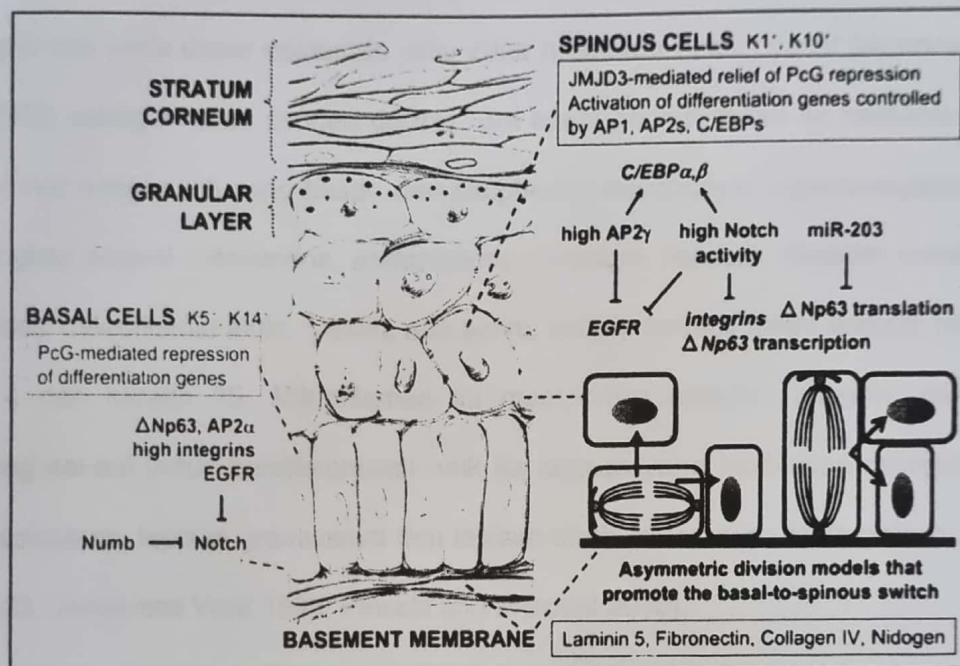
Kulit adalah organ terbesar dalam tubuh, yang berasal dari lapisan ektoderm (Henry and Ackerman 1992; Holbrook and Wolff 1993), berfungsi untuk melindungi, mempertahankan diri dari lingkungan luar seperti mikroba yang berbahaya, kehilangan air, kerusakan akibat fisik, kimia dan termal. Untuk melaksanakan tugasnya, kulit harus secara terus menerus memperbaharui jaringan epidermis dan apendiksnya dengan pembentukan sel-sel yang baru sepanjang hidup melalui keseimbangan antara proliferasi/diferensiasi dan apoptosis yang terkontrol yang disebut dengan homeostasis (Pincelli and Marconi 2010).

Kulit terdiri dari lapisan epidermis, dermis dan subkutis dengan ketebalan 1,5 – 4 mm. Di dalam lapisan epidermis dan dermis terdapat juga apendiks kulit seperti folikel rambut, kelenjar sebacea dan kelenjar ekrin. Lapisan epidermis dengan ketebalan hanya 0,4-1,5 mm terdiri dari lapisan germinativum atau basal (20%) disusul oleh lapisan sel-sel keratinosit (80%), yang terdiri dari lapisan spinosum, lapisan granulosum dan terakhir lapisan korneum. Didalam lapisan epidermis juga terdapat sel-sel imigran melanosit, sel Langerhans, sel Merkel dan limfosit (Henry and Ackerman 1992; Holbrook and Wolff 1993).

Pembentukan sel-sel keratinosit ini melalui suatu proses yang sangat rumit dan kompleks, yang diawali dari lapisan basal germinativum yang mengalami proses mitosis, proliferasi, perubahan metabolisme protein dan lipid dalam sel, terjadi perubahan morfologi pada plasma membran, antigen permukaan sel,

reseptor permukaan sel, dan terakhir mengalami diferensiasi sampai terbentuknya stratum korneum (Holbrook and Wolff 1993). Dalam keadaan normal proses pembentukan lapisan stratum korneum dari lapisan germinativum memerlukan waktu 14 hari, kemudian stratum korneum akan lepas/deskuamasi dari lapisan kulit dibawahnya. Proses homeostasis pergantian kulit ini sangat dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik (Henry and Ackerman 1992; Holbrook and Wolff 1993; Ghazizadeh and Taichman 2001; Charruyer, Barland et al. 2009).

(gambar 9-10)



Gambar 9 : Perubahan arsitektur dari sel basal sampai spinosum. Proliferasi dari sel basal dari epidermis yang menempel pada membran basal yang memisahkan lapisan dermis dari epidermis, lalu diferensiasi menjadi sel-sel spinosum pada lapisan suprabasal. Terjadi perubahan epigenetik dalam kromatin dan *signal Notch* yang aktif dalam sel-sel spinosum. Diduga *Notch* muncul timbul dalam sel basal melalui beberapa mekanisme, termasuk tidak adanya inhibitor *Notch*, yang diturunkan secara asimetri sesudah pembelahan sel basal. sebaliknya *signal Notch* menurunkan integrin dan ekspresi gen p63. model yang memperlihatkan perubahan pembelahan asimetris dari sel basal menjadi sel spinosum. *Cell Stem Cell*. (dikutip sesuai aslinya dari Minireview *Cell Stem Cell* 4, June 5, Elsevier Inc. 499-502, 2009)

Faktor intrinsik yang mempengaruhi proses proliferasi, diferensiasi dan apoptosis ini dipengaruhi oleh interaksi antara lapisan basal germinativum, zona membran basal, lapisan dermis, molekul matriks mesenkim kulit (seperti: kolagen, fibronektin, laminin 5 dan trombospondin), dan reseptor-reseptor plasma membran sitoskeleton dari keratinosit seperti reseptor *Epidermal Growth factor*, *Transforming Growth Factor* (TGF) dan reseptor integrin (Holbrook and Wolff 1993; Marconi, Dallaglio et al. 2007; Senoo, Pinto et al. 2007).

Lapisan basal germinativum epidermis adalah lapisan paling bawah yang menempel erat pada dasar epidermis yaitu zona membran basal (*Basal Membran Zone*, BMZ) sebagai batas dengan dermis. Sel basal germinativum ini berbentuk sel kolumnar dengan inti yang besar, dan sitoplasma mempunyai organel-organel yang lengkap seperti mitokondria, *endoplasmic reticulum*, lisosom, ribosom untuk mensintesis mikrofilamin aktin, miosin, alfa aktini, keratin terkecil mikro keratin 19, keratin 4 dan keratin 15. Mikrofilamen ini mempunyai reseptor integrin, dan menopang sel-sel untuk berdiferensiasi naik ke lapisan yang lebih atas menjadi lapisan spinosum, lapisan granulosum dan lapisan stratum korneum (Holbrook and Wolff 1993; Jones and Watt 1993; Pincelli and Marconi 2010).

Lapisan basal germinativum selalu mengalami siklus perubahan (proliferasi dan diferensiasi) untuk menjadi lapisan spinosum, granulosum dan korneum. Sel-sel pada lapisan basal germinativum terdiri atas dua komponen sel-sel yang heterogen dalam hal kemampuan proliferasi dan *self renewal*, Mereka terdiri atas

10% stem cells dengan kemampuan tinggi untuk membelah/mitosis namun kemampuan *self renewal* yang rendah dan 40% *Transit Amplifying cells* (TA) yang ekuivalen dengan *committed progenitors* jaringan hemopoetik karena memiliki kemampuan *self renewal* yang tinggi tetapi kemampuan proliferasi yang rendah (Holbrook and Wolff 1993, Li, Simmons et al. 1998; Braun, Niemann et al. 2003). Kelompok sel-sel di atas menyebar secara acak pada lapisan basal germinativum dan membentuk kelompok-kelompok *Epidermal Proliferative unit* (EPU). Satu kelompok berjumlah 10-14 sel yaitu gabungan dari 1 sel *stem cell* dan sejumlah *Comitted Progenitor* (CP) cells yang terdiri 9 *Transit Amplifying cell* (TA) dan 4-5 sel suprabasal post mitotik berbentuk heksagonal (Chao, Eck et al. 2008). Untuk menemukan *stem cell* pada lapisan basal epidermis adalah sulit dikenal tapi diduga terletak pada ujung dari *rete ridge* (Lavker and Tung-Tien Sun 1983). Satu *stem cell* yang melekat pada BMZ terletak diantara sel-sel basal dan dikelilingi oleh *post mitotic* sel dan TA membentuk EPU (Potten 1974, 1981) dengan lingkungan optimal *niche* yang menyokong kelangsungan hidup *stem cell* dan progenitornya untuk *self renewal* dan untuk proses diferensiasi (Jones and Watt 1993; Moore and Lemischka 2006; Muffler, Stark et al. 2008).

Sepuluh persen sel-sel basal germinativum yang mempunyai kemampuan untuk mitosis yang tinggi yang disebut sebagai *epidermal stem cell*, merupakan sel klonigenik, bersifat unipoten, bersifat *long life*, dengan fase S yang pendek pada siklus sel yang sangat lambat (Horsley, Aliprantis et al. 2008).

Kemampuan *stem cell* pada sel basal epidermis untuk *self renewal*, proliferasi dan diferensiasi menghasilkan sel-sel yang diklasifikasi dalam 3 jenis *clones*, *Holoclon*es dengan kapasitas produksi yang tinggi, *meroclon*es bersifat *intermediat*, dan *paraclon*es yang semua selnya akan berdiferensiasi secara acak menjadi sel-sel epidermis (Kaur and Potten 2011; Barrandon and Green, 1987). Sel-sel holoklon dibentuk langsung dari *stem cell*, mempunyai kemampuan tumbuh yang tinggi seperti *stem cell* (Lajtha 1979), selanjutnya menjadi meroklon atau paraklon. Untuk membedakan ketiga jenis klon ini secara spesifik masih belum ada marker yang spesifik, saat ini dapat dibedakan dengan cara mengidentifikasi kelompok integrin yang menjadi reseptor permukaan sel seperti $\alpha 5\beta 1$ (reseptor fibronectin), $\alpha 2\beta 1$ (reseptor kolagen), $\alpha 3\beta 1$ (reseptor laminin dan epiligrin). Berdasarkan ekspresi integrin, Philip dkk membagi sel proliferaatif menjadi 4 golongan yaitu *stem cell* dengan ekspresi $\beta 1$ intergrin yang sangat tinggi sehingga kemampuan melekat pada membran basal yang tinggi, TA dengan ekspresi $\beta 1$ integrin yang lebih rendah sehingga kemampuan melekat pada membran basal yg lebih rendah, *committed basal cell* dengan sedikit ekspresi integrin $\beta 1$ dan sel suprabasal yang sudah tidak terdapat mengekspresikan integrin $\beta 1$ sehingga bebas bergerak ke arah superfisial meninggalkan membran basal (Jones and Watt 1993; Marconi, Dallaglio et al. 2007).

Terdapat berbagai jenis integrin yaitu 18 jenis tipe α dan 8 jenis tipe β yang berperan sangat penting dalam melekatkan sel basal pada membran basal, Integrin $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha 11\beta 1$, berikatan dengan kolagen membran basal,

Integrin $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$, berikatan dengan laminin membran basal, Integrin $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, berikatan dengan fibronectin membran basal integrin $\alpha v\beta 1$ berikatan dengan vitronectin dan integrin $9\beta 1$ berikatan dengan membran basal (Brakebusch and Fassler 2005). Integrin-integrin ini menentukan kemampuan diferensiasi sel-sel basal menjadi sel terminal dan berikatan dengan protein *extracellular matrix* (ECM) yang banyak terdapat pada BMZ (Giangreco, Qin et al. 2008). Integrin $\beta 1$ juga berfungsi untuk mempertahankan *stem cell* tetap hidup, untuk migrasi sel, dan memicu proliferasi dan menghambat diferensiasi. (Brakebusch and Fassler 2005; Pincelli and Marconi 2010) (gambar 10).

Stem cell mempunyai hubungan yang khusus dengan lapisan membran basal karena mempunyai banyak reseptor protein matriks ECM seperti fibronectin, laminin 5, kolagen tipe I dan tipe IV, VCAM, hormon pertumbuhan (Piwko-Czuchra, Koegel et al. 2009; Pincelli and Marconi 2010), dan reseptor *tyrosin kinase growth factors* yang merangsang proliferasi lapisan basal epidermis (Fuchs and Raghavan 2002)

Hubungan tersebut diatas menunjukkan spesifikasi hubungan antara proliferasi dengan kemampuan melekatnya pada basal membran karena tingginya ekspresi integrin β . (Jones and Watt 1993; Jones, Harper et al. 1995; Legg, Jensen et al. 2003). Pada penelitian oleh Philip dkk 1993, ditemukan bahwa kemampuan sel-sel membentuk koloni atau *colony forming efficiency* (CFE) semakin tinggi pada sel-sel yang mempunyai reseptor $\beta 1$ integrin yang tinggi dan semakin mudah melekat

pada membran basal lapisan basal epidermis (Jones and Watt 1993; Tiberio, Marconi et al. 2002). Jadi $\beta 1$ *integrin* pada permukaan sel berbanding lurus dengan kemampuan proliferasi, *colony-forming efficiency* (CFE), kemampuan untuk melekat pada kolagen tipe IV, fibronektin dan *Extracellular matrix protein* (ECM). Pada kultur sel-sel pembentuk epidermis kulit tersebut, Philip juga menemukan sel-sel dengan bervariasi ukuran dan bentuk dari sel-sel holoklon dan sel yang semakin dewasa akan semakin berkurang ekspresi *integrin*nya, menyebabkan ikatan dengan ECM dari basal membran semakin berkurang, maka sel-sel suprabasal dari kelompok EPU akan terlepas dari membran basal dan juga akan kehilangan kemampuan mitosis dan segera berdiferensiasi keatas lapisan epidermis (Holbrook and Wolff 1993; Ito, Liu et al. 2005; Senoo, Pinto et al.2007; Aberdam 2008). Kemudian sel-sel tersebut akan memulai proses keratinisasi sejalan dengan meningkatnya kadar involukrin yang hanya terdapat pada sel-sel suprabasal untuk proses keratinisasi yang akhirnya menjadi stratum korneum (Green, Easley et al.2003; Barrandon and Green 1987).

Proses ini terus menerus berulang untuk menjaga homeostasis kulit yang diperankan oleh *epidermal stem cell* dan *skin-resident adult stem/progenitor cell* yang merupakan sel imatur dengan kemampuan *regenerative* dan berusia panjang yang sangat menentukan dalam menjaga homeostasis pada kulit. Homeostatis kulit terjadi terus menerus secara natural pada setiap individu semasa hidupnya yang diatur oleh faktor intrinsik seperti telah dikemukakan di atas. Homeostatis kulit terjadi juga jika ada kerusakan (luka) pada kulit (epidermis dan

folikel rambut) berarti homeostasis kulit dipengaruhi juga oleh signal ekstrinsik (Soehnge, Ouhtit et al. 1997; Matsumura and Ananthaswamy 2002; Donovan 2009; Mimeault and Batra 2010).

Menurut Laure dkk 2003 untuk mempertahankan homeostasis *stem cell*, pembelahan dari sel-sel tersebut bersifat asimetrik dan symetrik. (gambar 9). (Gambardella and Barrandon 2003; Fuchs 2009; Piwko-Czuchra, Koegel et al. 2009). Pembelahan asimetris bertujuan untuk mempertahankan *strand DNA* tetap sama sepanjang hidup dan mencegah penumpukan DNA yang sudah mengalami mutasi atau disebut juga dengan *immortal strand hypothesis* (Blanpain, Lowry et al. 2004; Luchi, Dabeisteen et al. 2006; Aberdam 2008; Sotiropoulou, Candi et al. 2008).

Siklus sel ini dapat dipercepat atau meningkat pada saat terjadinya luka atau proses karsinogenesis, namun akan semakin menurun dengan bertambahnya usia terutama pada apendiks kulit (Holbrook and Wolff 1993) Sedangkan lapisan epidermis akan lebih tahan terhadap pengaruh usia, karena stratum germinativum mempunyai *stem cell* yang dapat mempertahankan dan mempunyai kemampuan *self renewal* (Espada, Varela et al. 2007; Muffler, Stark et al. 2008), dan tidak terjadi apoptosis dan menetap di epidermis kulit, karena terdapat suatu molekul antiapoptosis survivin yang menghambat apoptosis sel (Pincelli and Marconi 2010). Akan tetapi bila terjadi mutasi *onkogen* atau *tumor supressor gene* yang menyebabkan proliferasi yang terus menerus dari *stem cell* dan tidak terjadi apoptosis (Watt, Celso et al. 2006),

maka keadaan tersebut dapat membuat *stem cell* menjadi sumber sel asal/*origin* dari kanker kulit (Muffler, Stark et al. 2008; Pincelli and Marconi 2010).

II.E. HUBUNGAN EPIDERMAL STEM CELL DENGAN MESENKIM

Sel basal epidermis mempunyai kemampuan berpolarisasi dan berinteraksi dengan lapisan dermis sebagai penentu lokal yang diatur oleh protein-protein khusus di lapisan dermis (Fuchs and Raghavan, 2002). Lapisan dermis memproduksi beberapa jenis sitokin seperti IL-1, IL6, dan IL8, serta neuropeptida (neurokrin) yang dapat berperan sebagai, parakrin dan autokrin yang turut mempengaruhi proses homeostasis kulit (gambar 10) (Holbrook and Wolff 1993; Senoo, Pinto et al. 2007; Pincelli and Marconi 2010).

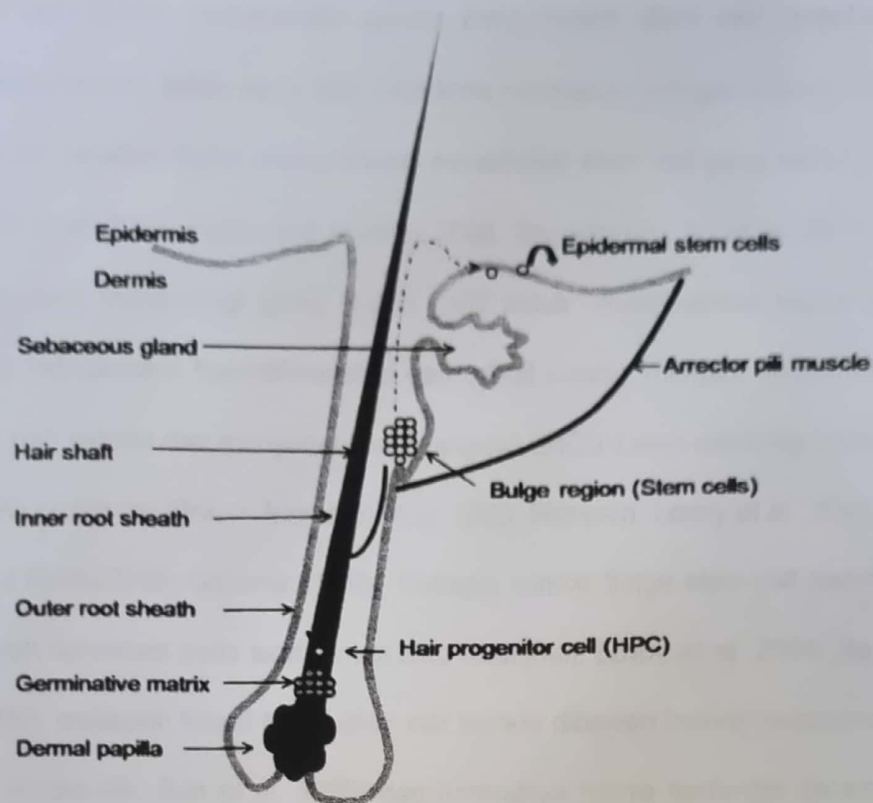
Hormon pertumbuhan (GF) yang terdapat di lapisan dermis bekerja autokrin dan parakrin akan memicu terjadinya proliferasi *stem cell*. EGF dan TGF α berikatan pada reseptor tirosin kinase pada sel basal memicu proliferasi sel dibantu oleh *Keratinocytes Growth Factors* (KGF) yang juga hanya ditemukan dalam dermis sebagai mitogen memicu mitosis sel basal yang mengawali proliferasi, sedangkan TGF- β 1 dan β 2 akan menekan sintesa DNA dan menyebabkan penurunan ekspresi β 1 integrin lalu memulai suatu proses diferensiasi sel ke arah stratum korneum (Holbrook and Wolff 1993; Atit, Conlon et al. 2003). Sellheyer pada tahun 2010 membuktikan adanya hubungan yang erat antara KSB dengan *mesenkim* dermis disekitarnya, yang menunjukkan marker

II.F. STEM CELL PADA EPIDERMIS DAN MARKERNYA

Stem cell adalah sel yang mempunyai kemampuan besar untuk *self renewal* sepanjang masa, dimana mampu menghasilkan turunan sel yang dapat berkembang menjadi sel dewasa (Lajtha 1979), dan turunan sel tersebut juga mempunyai kemampuan untuk *self renewal*. Karakteristik dari *stem cell* adalah belum berdiferensiasi (*undifferentiated*), mampu memperbanyak diri (*self renewal*) dan dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari satu jenis sel (multipoten/pluripoten) (Halim, Mukti et al. 2002).

Sifat sel pluripoten adalah kemampuan dari *stem cell* untuk berdiferensiasi menjadi sel tubuh apapun yaitu ketiga lapisan embrional ektoderm, mesoderm dan endoderm, sedangkan bersifat multipoten bila *stem cell* dapat berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel dalam lapisan embrional yang sama. Proses diferensiasi ini dipengaruhi faktor internal yaitu genetik dan epigenetik serta faktor eksternal sesuai yang dibutuhkan dari lingkungannya, seperti adanya hormon pertumbuhan (Halim, Mukti et al. 2002).

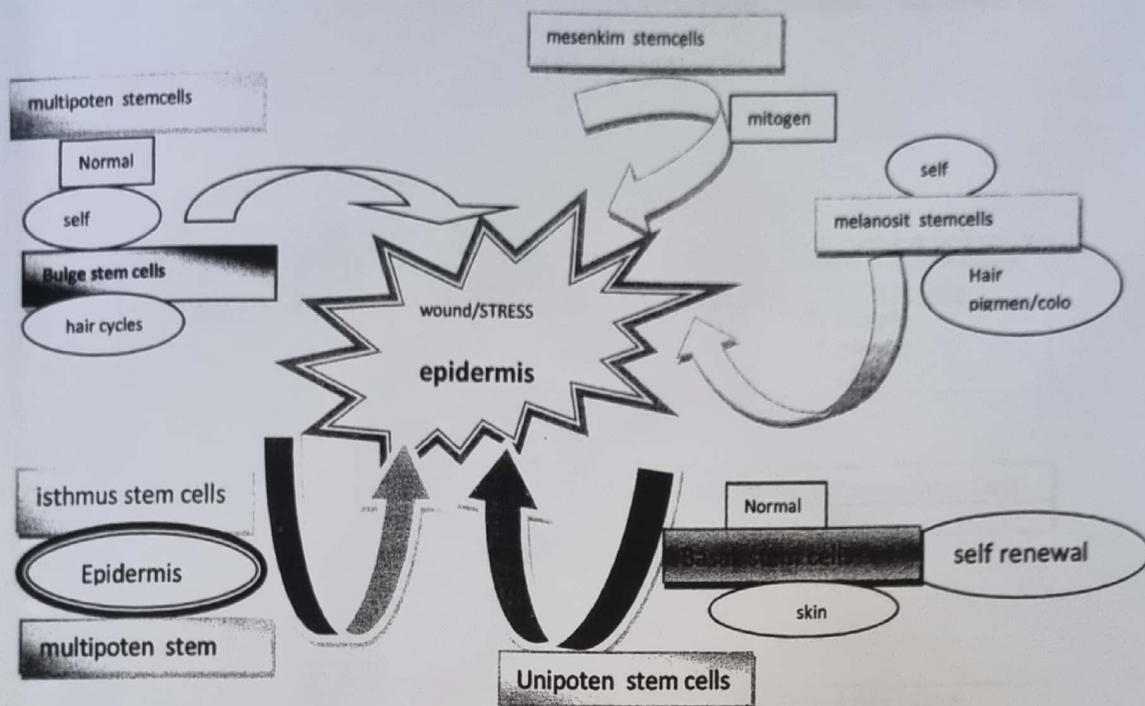
Stem cell pada kulit yang sudah diketahui sebelumnya terdapat pada 3 lokasi yaitu *stem cell* epidermis terletak pada interfolikuler sel basal, *Bulge stem cell* terletak pada folikel rambut di bawah insersi muskulus erektor pili dan *stem cell* kelenjar sebacea terletak di pangkal kelenjar sebacea (Cotsarelis, Sun et al. 1990). (gambar 11)



Gambar 11. Struktur folikel rambut. *Outer root sheath* folikel rambut berlanjut menjadi sel basal epidermis, sedang *inner root sheath* mengelilingi batang rambut. "Bulge region" berada di *outer root sheath* dekat insersi m. arrector pili. Bulge region mengandung banyak stem cell, yang sebagian berdiferensiasi menjadi sel progenitor rambut yang membentuk matriks germinatif. Matriks germinatif ini yang kemudian membentuk *inner root sheath* dan batang rambut. Walaupun epidermis normal memiliki *stem cell* yang berbeda dari folikel rambut, pada saat terjadi luka (artinya terjadi kerusakan *stem cell* epidermis), *stem cell* folikel rambut ini bisa dimobilisasi untuk memperbaiki epidermis (garis terputus). *Stem cell* di region *bulge* dari *outer root sheath* inilah yang selama ini dianggap sebagai asal histogenesis KSB. (Dikutip sesuai aslinya dari Donovan review article Dermatol Surg 2009)

Pada saat terjadi perbaharuan sel-sel baru, ketiga *stem cell* tersebut berperan sendiri-sendiri, tetapi pada saat terjadinya kerusakan jaringan epidermis, ketiga *stem cell* tersebut dapat memproduksi sel-sel dari *stem cell* yang berbeda (Levy, Lindon et al. 2007; Fuchs and Horsley 2008; Stojadinovic, Ito et al. 2011), yaitu dengan cara mengurangi ujung N-dari *Left1* untuk menghambat signal β katenin yang menginduksi *transdiferensiasi* dari folikel rambut menjadi epidermis interfolikuler dan sebosit dan menyebabkan hilangnya LRC (Label-retaining cells) primer melalui proliferasi (Braun, Niemann et al. 2003; Blanpain, Lowry et al. 2004; Blanpain and Fuchs.2009; Ohyama 2009). Sebagai contoh *Bulge stem cell* dapat tumbuh kearah epidermis pada saat terjadi luka (Blanpain, Lowry et al. 2004; Ito, Liu et al. 2005), walaupun lokasi *bulge stem cell* berada dibawah insersi *musculus erector pili* (Cotsarelis, Sun et al. 1990) dan normalnya hanya berfungsi dalam siklus rambut anagen, telogen dan katagen. Hal ini dapat terjadi karena *stem cell* pada folikel rambut bersifat multipoten dan selama pertumbuhan ini juga terjadi interaksi antara sel epitelial di kulit dengan mesenkimyang memandu arah diferensiasi menjadi folikel rambut, epidermis ataupun kelenjar sebacea. (Braun, Niemann et al. 2003) (Lihat gambar 12).

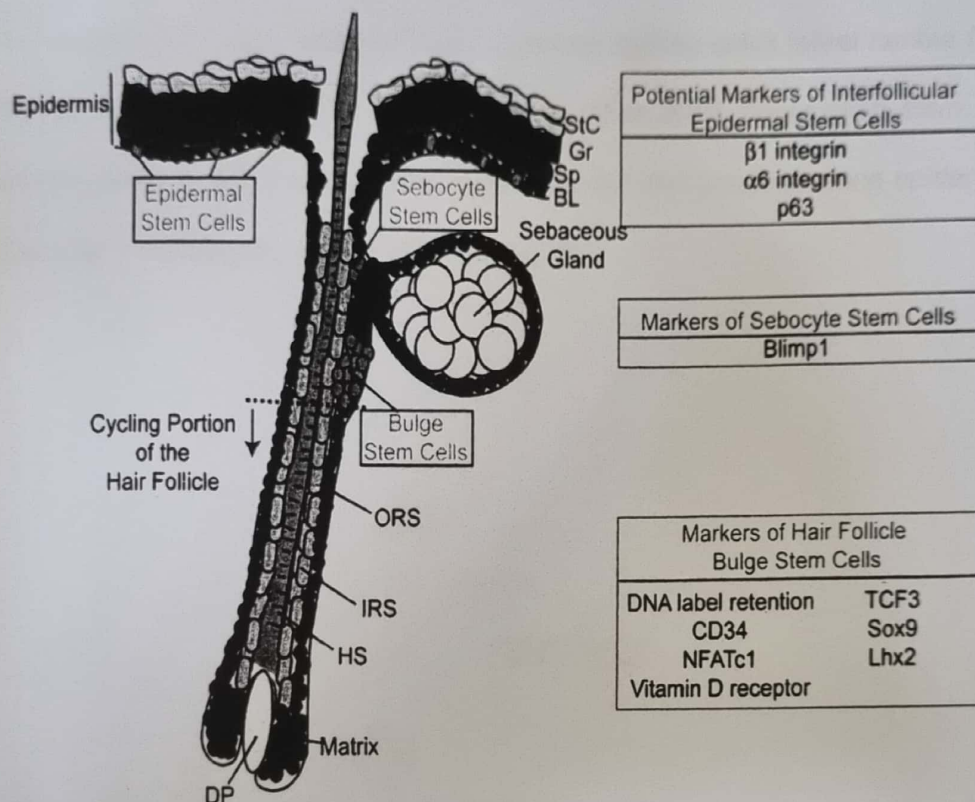
Gambar 12. ILUSTRASI FUNGSI STEM CELL



Gambar 12: ilustrasi fungsi dari stem cell dalam keadaan normal berperan sendiri-sendiri dalam mempertahankan sel klonnya, pada keadaan luka, stem cell tersebut bekerja sama dalam memperbaiki jaringan epidermis yang rusak

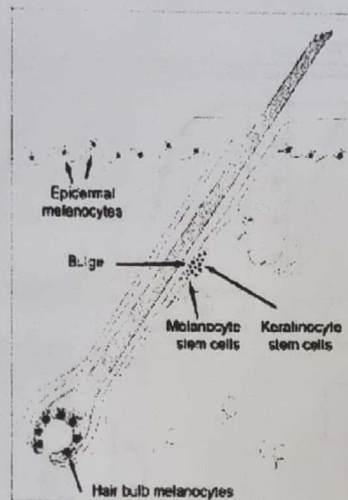
Untuk membedakan *stem cell* yang berasal dari folikuler ataupun non folikuler, Castilho melakukan penelitian pada kulit tikus, pada kerusakan gen Rac1 yang mempunyai potensial folikuler dan bagian komponen *stem cell*, menyebabkan ketidakmampuan untuk membentuk folikel rambut dan kelenjar sebacea, tetapi tetap mempunyai kemampuan untuk membentuk epidermis.

Penemuan ini membuktikan bahwa epidermis dan folikel rambut dipertahankan oleh *stem cell* yang berbeda (Moore and Lemischka 2006; Castilho, Squarize et al. 2007) (gambar 13).



Gambar 13: Bagian-bagian *stem cell* epithelial pada kulit . epidermis mempunyai populasi epidermal SCs (hijau) yang berada di lapisan basal (BL). Dalam gambar terdapat sebuah SCs yang kecil dan sejumlah sel TA (merah) dalam lapisan basal epidermis. SCs mengekspresikan integrin 1 dan 6 dan berdiferensiasi melalui delaminasi dan berpindah ke atas membentuk lapisan spinosum (sp), lapisan granulosum (Gr) dan stratum corneum (StC). Penemuan terbaru memperlihatkan kemampuan pembelahan secara asimetris pada sel basal yang mempunyai kemampuan self renewal, diferensiasi dan stratifikasi. *Sebaceous Glands* (SG) mempunyai sejumlah sel progenitor yang mengekspresikan reseptor transkripsional Blimp 1 dan berada didekat atau pada dasar SG. Progenitor SG berproliferasi dan diferensiasi menghasilkan lipid dalam sebot. Hair Follicular stem cells (HFSCs) bersirkulasi lebih lambat dan mengekspresikan molekul permukaan CD34 dan VdR, juga faktor-faktor transkripsi seperti TCF3, Sox9, Lhx2 dan NFATc1. sel Bulge mengatur sel-sel pada ORS yang diduga untuk memicu proliferasi sel-sel matriks yang mempengaruhi mesenkim DP. Sesudah proliferasi sel-sel matriks berdiferensiasi membentuk hair channel, IRS dan batang rambut.(Dikutip sesuai aslinya dari GENES & Skin stem cells. 22:976-985. Elaine fuch. Review)

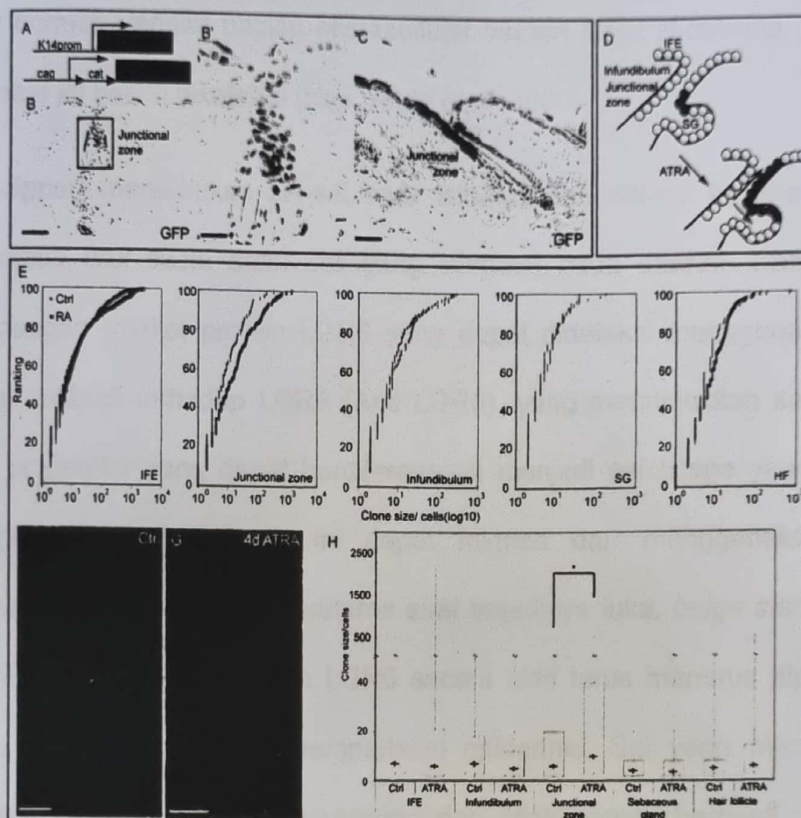
Selain ketiga jenis stem cel diatas, Carlo menemukan *stem cell mesenkim* pada daerah mesenkim kulit (Pincelli and Marconi 2010), Gambardella juga menemukan *stem cell* untuk melanosit dengan ciri khas *neural crest* terletak pada bagian bawah *bulge stem cells* pada daerah folikel rambut (Gambardella and Barrandon 2003) yang berperan dalam memberi pigmen untuk folikel rambut (Yu, Kumar et al. 2010). Lalu Snippert dkk pada tahun 2010 menemukan *stem cell* isthmus yang terletak pada sekitar isthmus sentral dan *junctional zone epidermis* (Gambar 14) (Snippert, Haegebarth et al. 2010)



Gambar 14 :Stem cell melanosit (Snippert 2010). Dikutip sesuai aslinya dari *Br JDermatol* 2011; 164:141-7

Pada bagian isthmus terdapat 2 subpopulasi sel multipoten dengan kemampuan klonogenit yang tinggi, yang pertama terletak pada daerah *Junctional* folikel rambut yang dapat diperiksa dengan marker LRIG1, dan Plet-1 yang dikenal dengan antibody MTS24 (Nijhof, Braun et al. 2006; Jensen, Collins et al. 2009; Pincelli and Marconi 2010), dan yang kedua oleh Snippet dkk mengidentifikasi suatu populasi

sel pada *central isthmus* yang bersifat germinatif positif dengan LGR6, tidak positif dengan MTS24 dan berperan untuk perkembangan semua *lineage* epidermis termasuk kelenjar sebacea dan lapisan basal epidermis sepanjang hidup, terletak sangat dekat dengan daerah positif LRIG1 dan MTS24 (Gambar 15-17) (Snippert, Haegerbarth et al. 2010).



Gambar 15. *Junctional Zone* folikel rambut. (A) Ekspresi Cre tanpa 4OHT (B and C) skematis gambaran migrasi sel pada junctional zone ke arah epidermis dan kelenjar sebacea (D) frekwensi distribusi klon dalam IFE, Junctional zone, infundibulum, SG, dan HF (E). LRIG1 pada junctional zone (merah) by Jensen et al. Page 20. (Dikutip sesuai aslinya dari : Published as: *Cell Stem Cell*. 2009 May 08; 4(5): 427–439).

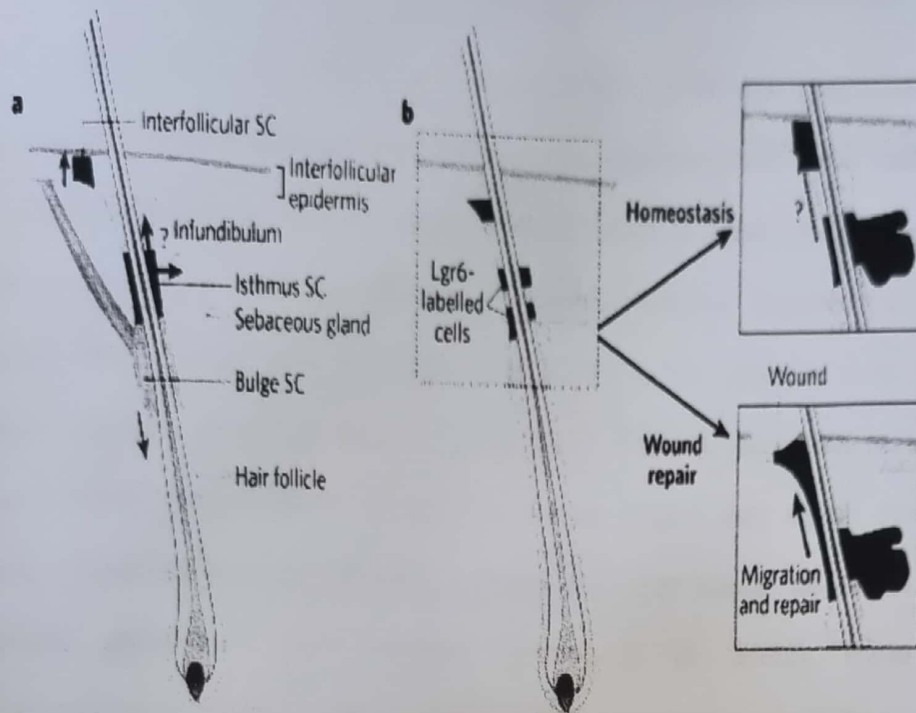
II.G. LGR6

LGR6 adalah *Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled 7 receptor precursor* terdiri dari 967 asam amino dengan berat molekul 104298 Da, Gen LGR6 mengkode sintese suatu glikoprotein transmembran yang berperan sebagai reseptor hormon dengan bagian ekstraselluler berupa *large N-termina*. Fungsinya sampai saat ini belum diketahui (Hsu, Kudo et al. 2000).

Snippert menemukan sel-sel baru isthmus dan sel-sel kelenjar sebacea yang tumbuh dari suatu *stem cell* yang berbeda pada daerah isthmus folikel rambut dengan marker protein LGR6 yang dapat dideteksi menggunakan suatu poliklonal antibodi terhadap LGR6 (Anti LGR6), yang menunjukkan kemampuan sebagai progenitor yang dapat berdiferensiasi menjadi sel *linage* yang berbeda pada epidermis kulit. Sel-sel ini dapat migrasi dan menggantikan sel-sel interfolikuler lapisan epidermis terutama saat terjadinya luka, *bulge stem cell* dan *stem cell* yang mengekspresikan LGR6 secara aktif terus menerus dipakai oleh interfolikuler epidermis untuk memperbaiki epidermis. Sel yang mengekspresi LGR6 siklusnya juga terus berlangsung dan tidak pernah berhenti sepanjang masa dan tidak diketahui kemana tujuannya.

Snippert dkk berusaha untuk menemukan sel induk dari *stem cell* epidermis "*the mother of the epidermal stem cells*", ditemukan bahwa reseptor transmembran LGR6 terekspresi pada folikel rambut dan interfolikuler epidermis

kulit selama pembentukan embrionik kulit, namun sesudah dewasa, Ekspresi LGR6 hanya terbatas pada daerah isthmus saja. Ditemukannya sel-sel yang mengekspresi LGR6 pada interfolikuler epidermis selama proses homeostasis masih merupakan suatu teka teki, namun dari penelitian oleh Snippert dkk disimpulkan bahwa :1). beberapa sel-sel isthmus mungkin berasal dari suatu *pool*/kantung progenitor pada folikel rambut yang berbeda dengan sel yang mengekspresi shh dan Sox9 dan migrasi ke interfolikuler epidermis yang berperan untuk mempertahankan homeostasis epidermis. 2.Mungkin ekspresi LGR6 lebih luas dibandingkan dengan shh dan Sox9, yang menandakan suatu populasi dari progenitor yang menetap pada daerah interfolikuler epidermis dan berkontribusi dalam perkembangan homeostasis fisiologis lokal sel-sel tersebut, terakhir bahwa luka yang sangat kecilpun atau adanya stress pada epidermis menyebabkan migrasi sel-sel dari folikuler menuju ke interfolikuler epidermis. (Gambar 16) (Snippert, Haegerbarth et al. 2010).



Gambar 16. Berbagai *stem cell* yang menjaga homeostasis kulit. a. anatomi epidermis kulit. panah menunjukkan arah dari diferensiasi progenitor *stem cell*, b. Snippert et al: menjelaskan bagian-bagian dari homeostasis kulit. LGR6 menunjukkan ekspresi progenitor original yang berasal dari daerah isthmus dari folikel rambut, yang menggantikan bagian isthmus yang baru dan sel-sel kelenjar sebacea. Selain itu bahkan sel ini dapat bermigrasi dan menggantikan sel interfolikuler epidermis pada saat terjadinya penyembuhan luka : (Dikutip sesuai aslinya dari : Snippert 2010.SCIENCE, vol 327, 1385-8. LGR6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin)

II. LRIG1(*Human leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*)

LRIG1 (dahulu disebut LIG-1) adalah suatu mRNA dan bagian dari protein permukaan sel transmembran yang terekspresi secara spesifik pada beberapa sel dari jaringan manusia dengan berat molekul 143kDa. Gen LRIG1 berlokasi di kromosom 3p14.3 (Hedman, Nilsson et al. 2002; Nilsson, Starefeldt et al. 2003; Gotoh 2009). Fungsi dan susunan molekul dari LRIG1 sampai saat ini masih belum diketahui (Hedman, Nilsson et al. 2002; Nilsson, Starefeldt et al. 2003; Gotoh 2009). Fungsi LRIG1 diduga merupakan bagian dari *signal transduction* yang memediasi reseptor hormon pertumbuhan dan dapat berfungsi sebagai reseptor permukaan sel (Hedman, Nilsson et al. 2002). Pada bagian ekstraselulernya berperan sebagai suatu inhibitor *epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated signalling* (Nilsson, Starefeldt et al. 2003; Gotoh 2009; Pincelli and Marconi 2010), signal transduksi EGFR berhubungan dengan kemampuan proliferasi sel-sel tumor. (Gambar 17-18)

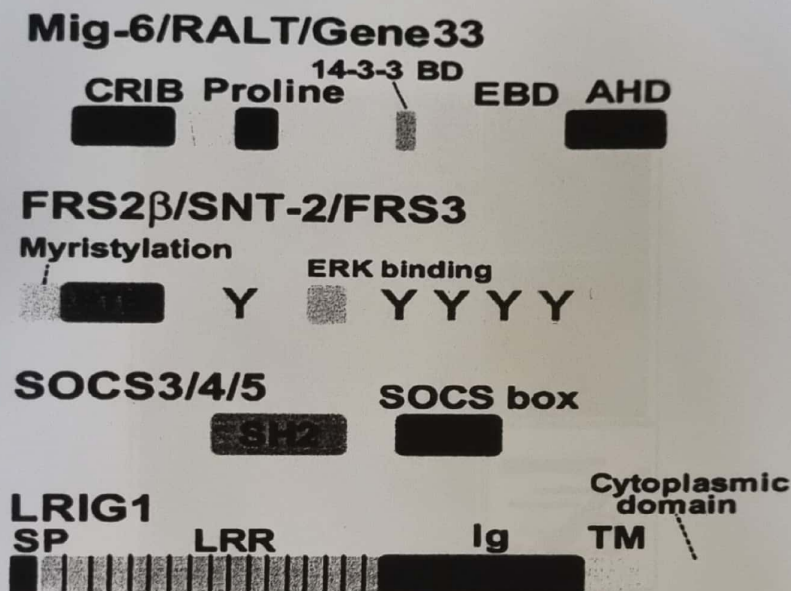
Pada pemeriksaan imunohistokimia LRIG1 ditemukan positif pada berbagai sel epitel dari jaringan organ tubuh manusia yang normal seperti prostat, kelenjar mammae, ileum, gaster, paru-paru, dan cortex cerebri (Gotoh 2009). Gen LRIG1 diketahui menghilang pada beberapa jenis kanker seperti pada kanker payudara, paru-paru, dan karsinoma sel skuamosa, sehingga LRIG1 dianggap sebagai *Human tumor suppressor gene* (Hedman, Nilsson et al. 2002). Kerusakan LRIG1 menghambat signal pengaturan aktivasi supresor tumor sehingga dapat memicu terjadinya aktivasi autokrin sehingga terus menerus proliferasi sel serta

mempertahankan kehidupan sel (Nilsson, Starefeldt et al. 2003; Segatto, Anastasi et al. 2011).

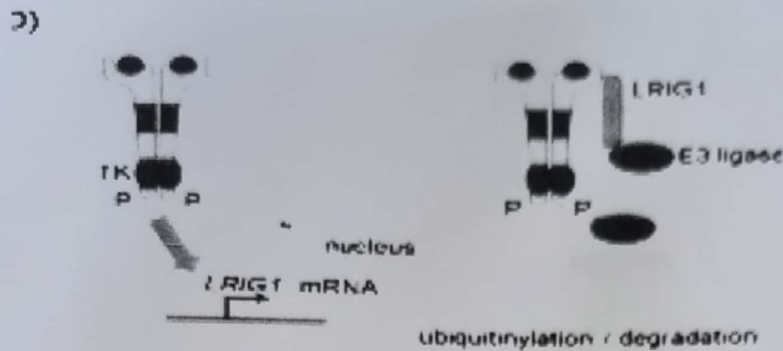
Pada kulit, LRIG1 merupakan suatu marker untuk *stem cell* interfolikuler yang lebih sering terdeteksi pada bagian atas dari rete ridge dan mempertahankan kelangsungan kehidupan *stem cell* yang terletak pada daerah *junctional zone* dekat dengan kelenjar sebacea dan infundibulum. (Jensen and Watt 2006; Jensen, Collins et al. 2009; Ohyama 2009), namun menurut Muffler dkk 2008, *stem cell epidermis* menyebar secara merata pada lapisan basal epidermis (Muffler, Stark et al. 2008). LRIG1 adalah protein transmembran yang berinteraksi dengan menurunkan signaling oleh reseptor-reseptor hormon pertumbuhan ErbB (Gur, Rubin et al. 2004; Laederich, Funes-Duran et al. 2004; Jensen and Watt 2006). LRIG1 juga merupakan gen target Myc (*Myc target gene*), (Laederich, Funes-Duran et al. 2004), dimana aktivasi cMyc pada epidermis dapat menyebabkan *depletion LRC* pada epidermis (Braun, Niemann et al. 2003) dan penurunan Myc ini bisa terjadi bila terjadi peningkatan LRIG1 (Jensen, Collins et al. 2009)

Pada kultur keratinosit, LRIG1 menghambat signal pengaturan *Epidermal Growth Factor* (EGF) oleh ERK MAPK dan menurunkan transkripsi cMyc, RNA, dan kadar protein, karena ekspresi yang berlebihan dari Myc epidermis dapat menrangsang proliferasi dan terminasi diferensiasi, diduga bahwa Myc menginduksi diferensiasi dan bertindak sebagai pengaman untuk mencegah proliferasi sel yang tidak terkontrol (Laederich, Funes-Duran et al. 2004). Pada penelitian terhadap kulit tikus dilaporkan bahwa sel yang mengekspresikan

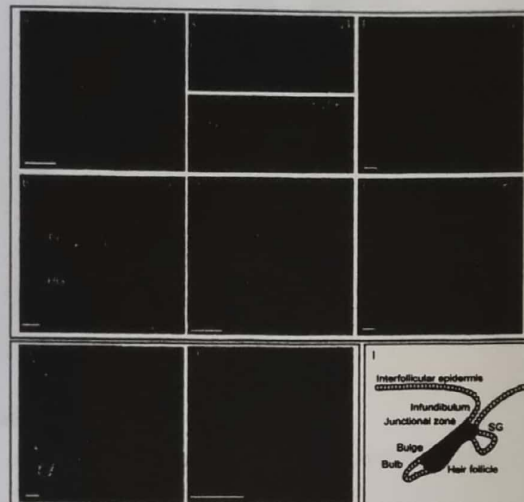
LRIG1 memperlihatkan suatu *multipoten stem cell* yang tidak khas untuk satu jenis stem cells, yang dalam keadaan normal berperan dalam menggantikan sel-sel interfolikuler epidermis dan kelenjar sebacea (Gur, Rubin et al. 2004; Jensen and Watt 2006). Ekspresi LRIG1 diperlukan untuk homeostasis epidermis, untuk menggantikan semua jenis sel epidermis dewasa. Bila terjadi kerusakan epidermis, LRIG1 secara genetik dapat meningkatkan kapasitas proliferasi epidermis dan terjadi ekspansi *stem cell* (Gambar 20) (Jensen and Watt 2006)



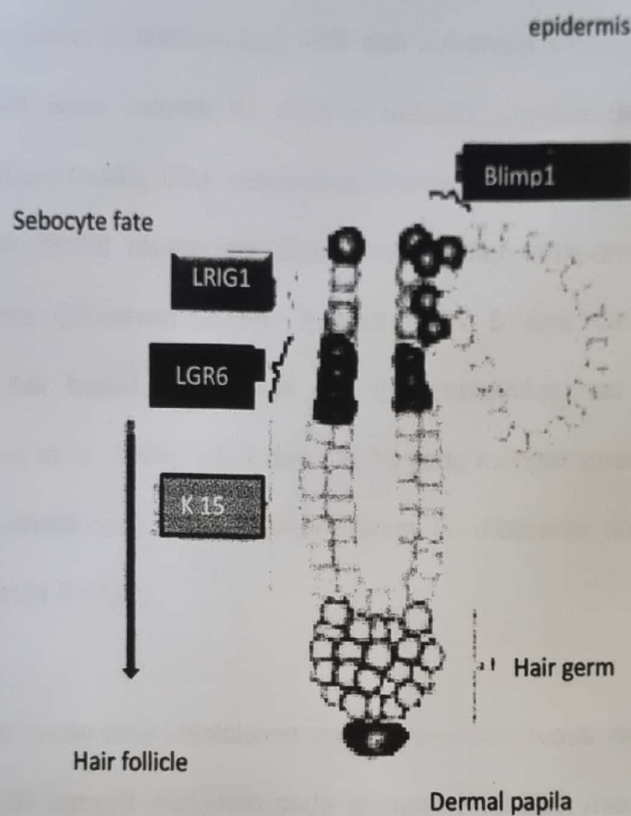
Gambar 17. Schematic structure inhibitors of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family members. In Mig-6/RALT, the proline-rich sequence binds to the Src homology 3 (SH3) domain of Grb2, the 14-3-3 binding domain (BD) binds to 14-3-3, and the ErbB2-binding domain (EBD) binds to the ErbB2 tyrosine kinase (TK) domain. The AH domain (AHD) is homologous to the Ack TK. The PTB domain of FRS2 β binds to a phosphorylated tyrosine (Y) residue of the NGF receptor or the unphosphorylated juxtamembrane region of the FGF receptor. SP, signal peptide; LRR, leucine-rich repeats; Ig, immunoglobulin-like domain; TM, transmembrane domain. (Dikutip sesuai aslinya dari *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (2009) 511–515 Noriko Gotoh)



Gambar 18. LRIG1 transcription is induced by stimulation with EGF. The translated LRIG1 binds to EGFR family members via its extracellular domain and recruits Cbl E3 ubiquitin ligase to its cytoplasmic tail, inducing ubiquitinylation/degradation of the EGFR family members. (Dikutip sesuai aslinya dari :The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41 (2009) 511–515 Noriko Gotoh)



Gambar 19 :Pada penelitian terhadap ekspresi LRIG1 pada kultur sel epidermis dari kulit kelinci ditemukan bahwa LRIG1 mulai ekspresi pada populasi sel-sel tertentu pada awal pertumbuhan kelenjar sebacea dan epidermis, mulai terlihat di daerah *junctional zone* (E,B,G), diantara infundibulum, *bulge* folikel rambut dan kelenjar sebacea. (gambar A,C,D,I) Pada fase pertumbuhan rambut ekspresi LRIG1 terlihat pada fase pertumbuhan anagen rambut diatas *bulb* folikel rambut (B,G,F), pada keadaan dimana terdapat rangsangan dari proliferasi interfolikuler, LRIG1 dapat bersifat bipoten pada kulit normal (D). (Dikutip sesuai aslinya dari Cell Tissue Res(2003) 312:65-71., Nillson J)



Gambar 20 : *Progression of bulge stem cell fates in pilosebaceous unit. CD34⁺ dan K15⁺ bulge cells (hijau) berkontribusi pada folikel rambut bagian bawah bulge atau pada bagian atas kelenjar sebacea. The sebaceous gland fate of bulge cells involves cell migration through the LGR6⁺ (blue), LRIG1⁺ (orange) and Blimp1⁺ (red) regions of the upper follicle before they differentiate into the oil producing sebocytes. (Dikutip sesuai dari aslinya dari ; The EMBO Journal 2011: 30, 2986-2987 Valerie Horsley)*

II.1. MARKER STEM CELL DENGAN PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA UNTUK KARSINOMA SEL BASAL

Untuk mengidentifikasi sel khusus origin dari KSB, banyak penelitian mengenai ekspresi sitokeratin dari KSB dan beberapa komponen bagian sel dari folikel rambut yang selama ini diyakini sebagai sumber dari sel origin KSB. Sitokeratin (*Cytokeratin*, CK) merupakan protein utama dari sel-sel folikel rambut yang banyak diteliti markernya untuk mengetahui tahapan-tahapan dan jenis diferensiasinya (Donovan 2009). Seperti CK 5 dan CK 14 menunjukkan diferensiasi sel basal, sedangkan CK 8 menunjukkan sel epitelium (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999). CK 1 dan CK 10 yang mengekspresikan kornifikasi sel epitelium. Pemeriksaan untuk marker-marker ini dilakukan dengan pemeriksaan imunohistokimia (IHK).

Pemeriksaan imunohistokimia dan pewarnaan khusus yang dilakukan untuk penelitian KSB banyak dilakukan pada jaringan KSB kulit manusia, tikus, anjing, dan kultur jaringan (Mikaelian and Wong 2003; Donovan 2009). Penelitian pada jaringan KSB anjing dengan pewarnaan PAS menunjukkan 100% positif untuk glikogen pada ORS (Mikaelian and Wong 2003), sedangkan untuk marker *stem Cell* jaringan manusia, pertama kali dilakukan oleh Lyel dkk pada tahun 1999, yang menggunakan suatu reaksi silang yang spesifik dengan anti-CD8 antibodi monoclonal (DAKO clone C8/144B) dengan CK 15 yang ditetapkan sebagai pewarnaan untuk folikuler *bulgemanusia* (Inoue, Aoi et al. 2009).

Moll menemukan CK 15 hanya positif 27% pada jaringan KSB pada parafin blok (Sellheyer 2011). Lane dkk menggunakan marker *stem cell* CK 19 yang bukan suatu marker *stem cell* yang spesifik seperti CK15. Terakhir diketahui bahwa CK19 lebih digunakan untuk pewarnaan *transient amplifying cell* dan positif antara 0-100% untuk jaringan KSB (Sellheyer 2011), dan CK19 selalu negatif pada interfolikuler keratinosit epidermis. Penemuan CK 19 ini membuat dugaan bahwa KSB mirip dengan *stem cell* yang berasal dari region *bulge* folikel rambut vellus (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999; Gho, Braun et al. 2004).

KSB sering mengekspresikan keratin K5, K14, K17, dan kadang-kadang K15 dan K19. Pemeriksaan imunohistokimia untuk ORS dengan CK 5, CK8, CK14, dan CK 19 ternyata positif untuk KSB. Kadang-kadang ORS juga mengekspresikan K15, K6a/6b, K16, K17 (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999; Donovan 2009; Sellheyer 2011). Pada sel-sel interfolikuler epidermis khas mengekspresikan hanya K5 dan K14, dan kadang-kadang K15 (Donovan 2009). CK 1 dan CK 10 yang mengekspresikan kornifikasi sel epitelium menunjukkan positif lemah pada KSB, jadi CK1,CK10,CK19 bervariasi pada KSB, dan ekspresi menetap pada ORS, folikuler bulbar region dan selalu negatif pada keratinosit interfolikuler epidermis (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999).

Pada penelitian oleh Markey dkk ditemukan adanya sitokeratin 5, 14 dan 17 pada jaringan tumor KSB, dimana sitokeratin 5 dan 14 terdapat pada lapisan basal epidermis, sedangkan sitokeratin 17 yang terdapat pada ORS folikel rambut dan spesifik untuk unit pilosebacea mendukung bahwa sel origin KSB berasal dari daerah apendiks kulit, namun dilihat dari gambaran pulau-pulau KSB dan lesi KSB

yang selalu berasal dari bagian bawah lapisan sel basal epidermis dan bukan berasal dari struktur folikel rambut, maka diduga bahwa tumor mungkin berasal dari sel *transformed interfolikuler pluripotent stem cells* yang berdiferensiasi menjadi struktur folikuler (Markey, Lane et al. 1992)

Selain marker sitokeratin, marker lain seperti BerEP4 juga digunakan sebagai marker untuk KSB untuk membedakan dengan karsinoma sel skuamosa (KSS), walaupun tidak khas, tetapi BerEP4 ditemukan positif pada 82% (37/45) (Winters, Naud et al. 2008), Fitzpatrick et al. 1998). Antibodi BerEP4, suatu *anti-human epithelial antigen*, adalah suatu antibodi monoklonal berikatan langsung dengan glikopolipectida pada membran spesifik sel-sel epitel manusia dengan berat molekul 34-39 kilodalton, memberi hasil dengan reaksi positif kuat pada sel-sel epitel sehingga, dan dapat digunakan untuk membedakannya dengan sel-sel mesotelial dan juga untuk diagnosis banding dengan *undifferentiated primary of metastatic tumor* (Latza, Niedobitek et al. 1990).

Pada penelitian Yu terhadap karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa ditemukan bahwa BerEP4 positif pada semua kasus KSB pada sitoplasma dan membran sel dari sel-sel KSB, jadi IHC BerEP4 dapat digunakan untuk membedakan KSB dengan karsinoma sel skuamosa, demikian juga untuk membedakan KSB dengan keratosis seboroik (Yu, Galan et al. 2009), dan folikel rambut (Winters, Naud et al. 2008), sebaceoma (Fan, Car et al. 2007), karsinoma basoskuamos kulit (Tellechea, J.P. Reis et al. 1993; Beer, Shepherd et al. 2000). Bcl-2 yang juga positif pada pemeriksaan untuk KSB digunakan untuk

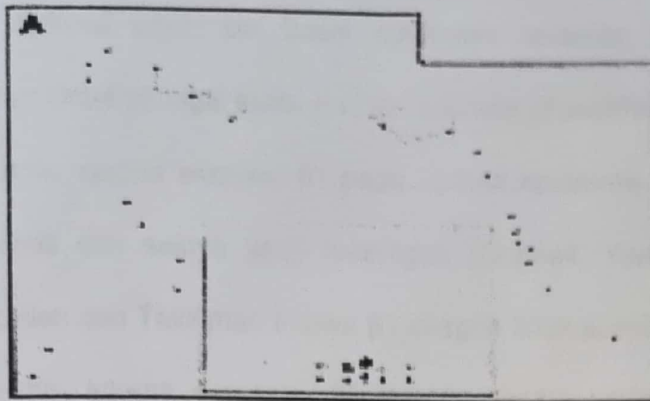
membedakan KSB dengan trikhoepitelioma, sedangkan SMA (*smooth muscle actin*) menunjukkan sebagian positif dan negatif untuk KSB (Swanson, Fitzpatrick et al. 1998).

Pada tahun 2010, Sellheyer melakukan penelitian dan menemukan ekspresi dari *epithelial cell adhesion molecule* (Ep-CAM) juga SOX9, suatu faktor transkrip nukleus yang khas seperti marker pada KSB dan folikuler ORS, yang menambah pembuktian kemiripan antara germinativum embrionik rambut dengan KSB, namun semua pemeriksaan dengan marker *stem cell* tidak ada yang menunjukkan suatu gambaran karakteristik yang khusus dan 100% untuk KSB. Suatu *stem cell* dapat berkembang menjadi dua *stem cell* yang lain, atau menjadi *stem cell* asimetrik yang lain, atau menjadi suatu *transient amplifying cell*, dan terakhir ini akan hilang kemampuan untuk self-renewal dan berdiferensiasi menjadi sel yang lain.

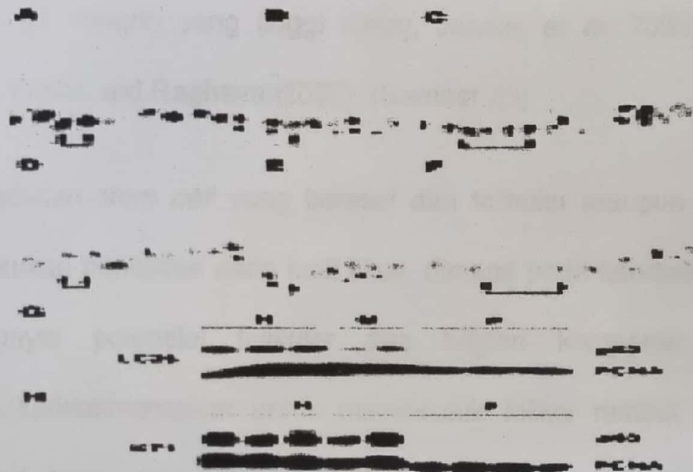
Menurut Amy dkk 1998, untuk membedakan *stem cell* putatif yang tidak jelas lokasinya dari *stem cell* epidermis dibanding dengan sel basal yang lain, dapat dilakukan dengan cara pemeriksaan kadar *adhesive molecule* pada hemidesmosom $\alpha 6\beta 4$ integrin dan kadar proliferasi yang rendah dari marker permukaan sel mAb 10G7 (Li, Simmons et al. 1998), dengan pemeriksaan marker $\beta 1$ integrin, $\alpha 6$ integrin, P63, dan AC133-2. Kelihatan lokasinya lebih dominan pada daerah bawah dari rete ridge epidermis, hal ini berhubungan dengan sifat proteksi terhadap *stem cells* (Ghazizadeh and Taichman 2005).

Seperti diketahui bahwa sel-sel holoklone yang dihasilkan oleh *stem cell epidermis* mempunyai kadar β 1 integrin dan P63 yang tinggi, kadar CD71 yang rendah (Gambardella and Barrandon 2003; Senoo, Pinto et al. 2007), sedangkan sel TA mengandung CD71 yg rendah dan α 6 integrin yang tinggi (Jones and Watt 1993; Pincelli and Marconi 2010).

P63 transcription factor suatu protein yang homolog dengan P53 sangat penting dalam mempertahankan prekursor *stem cell* (Liefer, Koster et al. 2000; Medawar, Virolle et al. 2008) untuk regeneratif, mempengaruhi laju proliferasi perkembangan epitel keratinosit. P63 diekspresikan dalam jumlah yang sangat banyak pada sel-sel holoklon, dapat digunakan untuk membedakan *stem cell* keratinosit dengan paraklon atau sel TA yang sudah mengalami penurunan yang banyak ekspresi p63 (Green, Easley et al. 2003; Lena, Shalom-Feuerstein et al. 2008). P63 dapat digunakan sebagai marker *stem cell* keratinosit dalam kultur epitel, aplikasi klinik dan dalam mempelajari tumorigenitas epitel (Pellegrini, Dellambra et al. 2001). Pada folikel rambut manusia, p63 juga diekspreskan oleh keratinosit yang membentuk ORS pada *bulb* keratinosit sekitar papilla folikuler (Gambar 21-22)



Gambar 21 : Ekspresi p63 pada stem cell epidermis dan sel TA manusia (A). kultur sel keratinosit epidermis yang diwarnai dengan p63-mAB spesifik. P63 berada di lapisan basal sel. terlihat p63+ sel berlokasi diantara sel sebagai sel yang tunggal (tanda kepala panah) dan patches (tanda panah) diantara sel-sel yang negatif p63. Dengan pembesaran (inset) dapat dilihat sel-sel dengan ekspresi kadar p63 yang tinggi berbeda jelas dengan yang rendah, dan yang negatif. (B) analisa klonal dari dua donor yang berbeda (K71 dan K100). sel yang diekstrak diambil dari kultur jaringan. (Dikutip sesuai aslinya dari PNAS. 98:3156-3161).

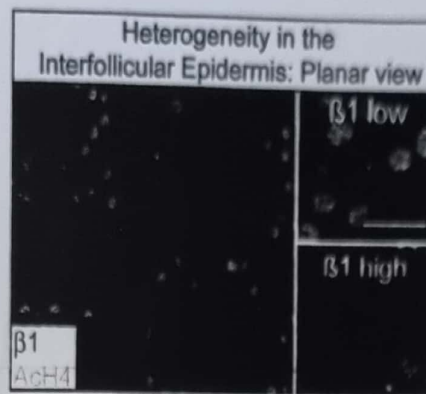


gambar 22 : ekspresi p63 dan PCNA oleh stem sel keratinosit dan sel-sel TA (A-F)
Expression of p63 and PCNA by keratinocyte stem and TA cells. (A-F) Parallel sections of limbal biopsies were stained with p63-specific mAb (A-C) and PCNA-specific mAb (D-F). Arrows indicate basal cells that expressed p63, but not PCNA. Black asterisks indicate cells that expressed both p63 and PCNA. B and E note a p63⁺/PCNA⁺ cell (black asterisks) flanked by cells expressing PCNA, but not p63 (red asterisks). (G and H) Clonal analysis of subconfluent primary corneal (LC25) and epidermal (K71) cultures. Cell extracts were prepared from cultures generated by holoclones (H), meroclones (M), and paraclones (P). Equal amounts of protein were fractionated on 7.5% (G) or on 12.5% (H) SDS-polyacrylamide gels, transferred to PVDF filters and immunostained with p63-specific mAb (p63) and with PCNA-specific mAb (PCNA). (Dikutip sesuai aslinya dari PNAS. 98:3156-3161).

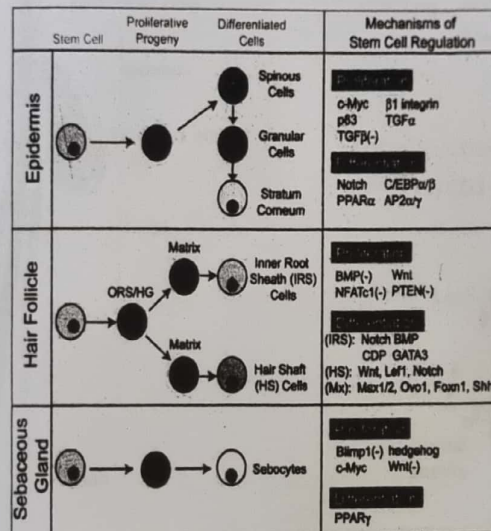
Menurut Grinnel pada sel basal epidermis terdapat juga *embryonic transcription factor* Oct-4 sebagai suatu *master regulator of undifferentiated state* di basal sel epidermis, karena ekspresi $\beta 1$ pada lapisan epidermis dengan gradasi yang berbeda-beda dan selnya yang heterogen (Grinnell, Yang et al. 2007). Menurut Ghazizadeh dan Taichman bahwa $\beta 1$ integrin tidak spesifik untuk marker *stem cell* epidermis, karena ekspresi $\beta 1$ integrin secara uniform positif pada interfolikuler epidermis, kelenjar sebacea dan ORS terutama pada bagian *bulbanagen* folikel rambut (Ghazizadeh and Taichman 2001; Braun, Niemann et al. 2003). Menurut penelitian Fuchs, hal ini dapat dibantu dengan pemeriksaan dengan marker AcH4 (*Acetylated histone H4*) yang menurun pada sel-sel dengan kadar $\beta 1$ integrin yang tinggi (Legg, Jensen et al. 2003; Pincelli and Marconi 2010; Fuchs and Raghavan 2002) (Gambar 23)

Untuk membedakan *stem cell* yang berasal dari folikuler ataupun non folikuler, Castilho melakukan penelitian pada kulit tikus, dimana pada kerusakan gen Rac1 yang mempunyai potensial folikuler dan bagian komponen *stem cell*, menyebabkan ketidakmampuan untuk membentuk folikel rambut dan kelenjar sebacea, tetapi tetap mempunyai kemampuan untuk membentuk epidermis. Penemuan ini membuktikan bahwa epidermis dan folikel rambut dipertahankan oleh *stem cell* yang berbeda (Castilho, Squarize et al. 2007).

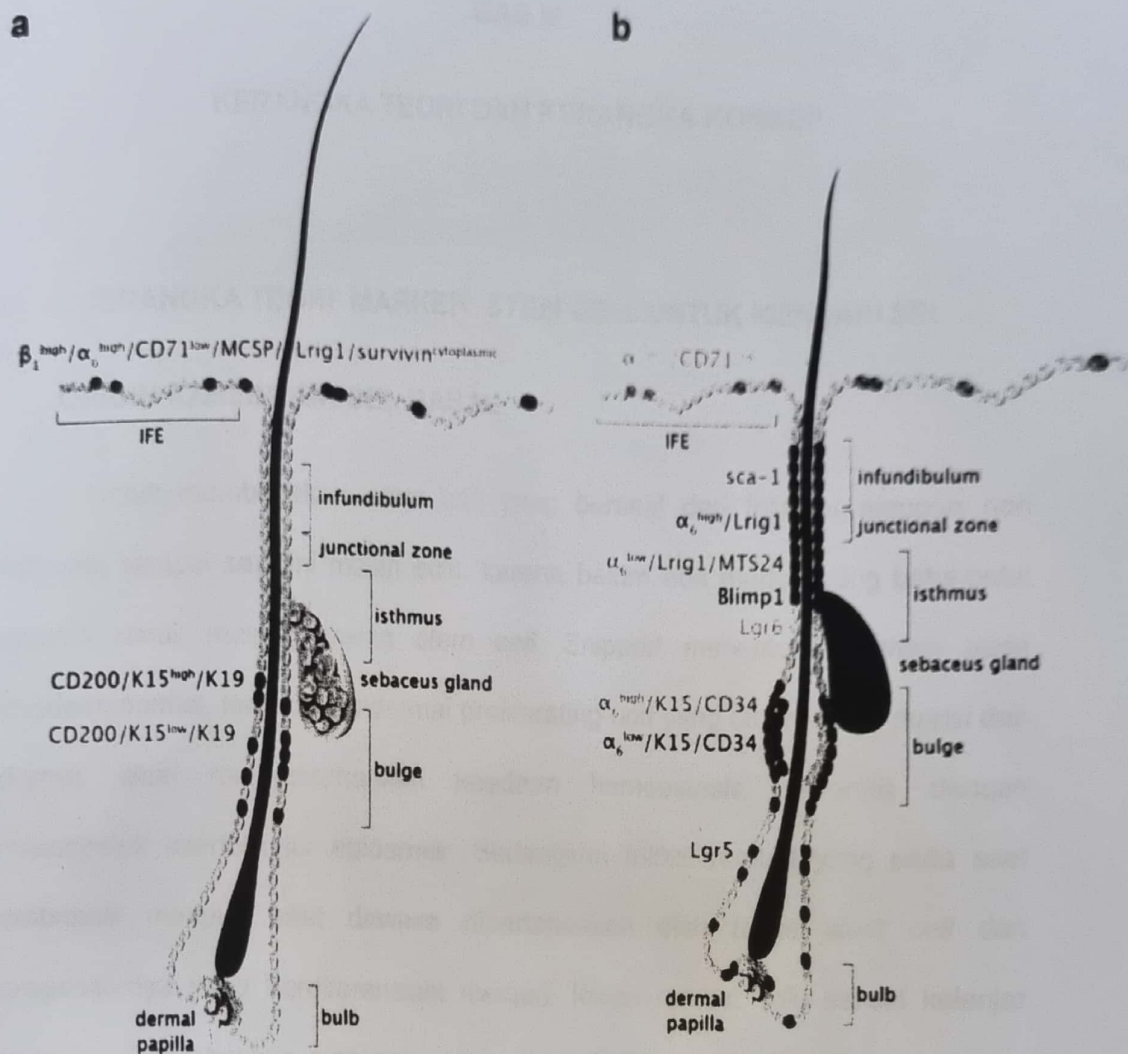
Jadi dapat disimpulkan bahwa sampai saat ini masih belum ada marker sel yang khusus dan spesifik untuk *stem cell* epidermis tertentu (Sellheyer 2011). (Gambar 24-26)



Gambar 23. Heterogenitas dalam lapisan epidermis. Perbedaan ekspresi integrin 1 acetylated histone H4 (AcH4) dalam lapisan epidermis manusia. Pada kadar integrin 1 yang tinggi terlihat kadar acetylated histone H4 yang menurun, diduga bahwa model kromatin mungkin berperan dalam pengaturan SCs epidermis (Images courtesy of F. Watt) (Frye et al.2007. (Dikutip sesuai aslinya dari :GENES & DEVELOPMENT 22:976-985 © 2008 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/08; www.genesdev.org)



Gambar 24. Mekanisme molekul yang mengontrol proliferasi dan diferensiasi epithelial di kulit. Epidermal SCs menghasilkan 3 jenis diferensiasi sel : sel-sel spinosum, sel-sel granulosum dan sel-sel stratum korneum. Proliferasi epidermal stem cells diatur oleh integrin 1 dan TGF dan TGF negatif melalui signal TGF, selanjutnya faktor transkripsi c-Myc dan p63 mengontrol proliferasi epidermis. kontrol proliferasi epidermis. Notch signaling dan the transcription factors PPAR α , AP2 α/γ , dan C/EBP α/β mengontrol diferensiasi dari sel-sel epidermis. HF SCs pada regio bulge menghasilkan beberapa sel-sel progenitor di ORS /HG dan matriksnya, yang memproduksi 2 linage yang berbeda : HS dan IRS. proliferasi sel-sel Bulge dikontrol secara negatif oleh signal BMP dan factor transkripsi NFATc1 dan P-TEN, dan secara positif oleh signal Wnt. (Dikutip sesuai aslinya dari :GENES & DEVELOPMENT 22:976-985 © 2008 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/08; www.genesdev.org)



Gambar 25: skematis lokasi dari subpopulasi keratinosit pada manusia dan epidermis tikus. beberapa tempat dari stem cell epidermis berkompeten untuk diferensiasi sepanjang lineage epidermis selama homeostasis jaringan. masing-masing bertanggung jawab terhadap populasi spesifiknya, setiap bagian dari stem cell dapat berregenerasi menjadi seluruh struktur epidermis. pada manusia, IFE KSCs lebih khusus dibanding dengan HF KSCs(a), sedangkan pada tikus kebanyakan marker stem cell terdeteksi pada HF(b) diambil dari : Mini review: Carlo Pincelli. Keratinocyte stem cells: (Dikutip sesuai aslinya dari : journal of cellular Physiology. .cell.Physiol. 225: 310-315,2010).

BAB III

KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP

III. A. KERANGKA TEORI MARKER *STEM CELL* UNTUK Mencari Sel

ORIGIN KARSINOMA SEL BASAL

Untuk membedakan *stem cell* yang berasal dari folikuler ataupun non folikuler, sampai saat ini masih sulit, karena belum ada marker yang betul-betul spesifik untuk masing-masing *stem cell*. Snippert menemukan bahwa pada keadaan normal, terdapat epidermal proliferasi unit yang dibantu oleh nutrisi dari dermis akan mempertahankan keadaan homeostasis epidermis dengan membentuk interfolikuler epidermis. Sedangkan folikel rambut yang pada saat embrionik maupun saat dewasa dipertahankan oleh *bulge stem cell* dan progenitornya yang berdiferensiasi menjadi folikel rambut, lalu sel-sel kelenjar sebacea dipertahankan oleh progenitor diatas *bulge*, yang mengekspresi protein *Blimp1* pada saat morfogenesis.

Snippert juga menemukan pada bagian atas folikel rambut yaitu infundibulum yang berinteraksi dengan interfolikuler epidermis dipertahankan oleh progenitor yang berada di folikel rambut yang disebut dengan *isthmus stem cell*, sel ini akan mengekspresikan marker protein MTS24 dan LRIG1 yang juga dapat berdiferensiasi menjadi semua *lineage* sel-sel epidermis pada saat terjadi luka.

LGR6 sebagai marker untuk progenitor yang dapat berdiferensiasi menjadi *lineage* sel yang berbeda dari epidermis kulit. LGR6 mengekspresi *earliest embryonic hair placodes*. Oleh Snippert, LGR6 ini disimpulkan sebagai *the most primitive epidermal stem cell*" (Blanpain 2010; Snippert, Haegerbarth et al. 2010).

Pada pemeriksaan marker protein LGR6 untuk interfolikuler epidermis yang berasal dari *bulge stem cells*, ternyata berbeda dengan folikel rambut dewasa yang positif dengan *shh* dan *Sox9*. Pada saat prenatal LGR6 terdapat pada folikel rambut, kelenjar sebacea, dan interfolikuler epidermis sedangkan pada binatang yang dewasa, LGR6 hanya terekspresi oleh daerah istmus, dan 1/3 dari pada sel yang mengekspresi LGR6 juga mengekspresi MTS24 dan sedikit *Blimp1*. (Snippert, Haegerbarth et al. 2010)

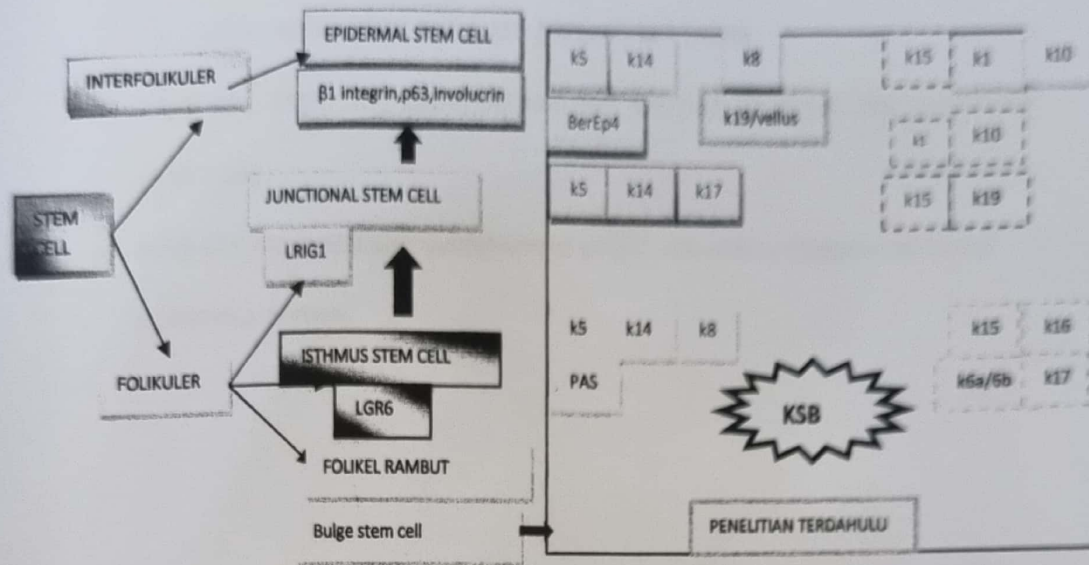
Pada penelitian menggunakan kultur jaringan kulit, yang dilakukan oleh Youseff K dkk pada tahun 2010, menyimpulkan juga bahwa *bulge stem cell* sebagai multipoten *stem cell* berperan pada penggantian sel epidermis pada saat terjadi luka. Namun untuk homeostasis natural sel epidermis interfolikuler, bagian *infundibulum* (daerah pertemuan antara epidermis dengan folikel rambut), bagian *isthmus*, dan kelenjar sebacea diyakini tidak diperankan oleh *bulge stem cell*, tetapi diduga adanya suatu *resident stem cell* yang berbeda, seperti yang didikemukakan oleh Snippert yaitu *isthmus stem cell*. Pada penelitian Youssef disimpulkan bahwa sel origin dari KSB berasal dari bagian epidermis interfolikuler dan bagian atas *infundibulum* (Mehregan 1985; Snippert, Haegerbarth et al. 2010;

Youssef, Keymeulen et al. 2010).Castilho juga menemukan bahwa epidermis dan folikel rambut dipertahankan oleh *stem cell* yang berbeda, dan KSB diduga bukan berasal dari *bulge stem cell* (Castilho, Squarize et al. 2007). Peter Heenan dan Mahmud Ghaznawienemukan gambaran histopatologi dari jaringan KSB stadium sangat dini, menunjukkan bahwa lesi awal KSB terlihat bermula di acro-infundibulum dan acro-syringium (personal communication).

Kesimpulan dari hasil penemuan oleh Snippert, Castilho, Youssef dan Peter Heenan dan Mahmud Ghaznawie ini, dapat diduga bahwa KSB berasal *isthmus stem cell*, tumbuh ke arah *junctional zone* di atasnya kemudian ke arah epidermis. Oleh sebab itu,pada penelitian ini dipilih sejumlah variabel yang diteliti pada KSB yaitu :

1. BerEP4 untuk mengidentifikasi lokasi (*site origin*) sel KSB stadium dini, apakah di interfolikuler atau di folikuler dan untuk diagnosis dini KSB. Karena dapat membedakan sel KSB dengan sel basal normal,
2. LGR6 yang berperan sebagai marker *isthmus stem cell* sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi *stem cells origin* dari KSB jika berasal dari *isthmus stem cell* .
3. LRIG1 yang berperan sebagai marker *junctional stem cells* sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi *stem cells origin* dari KSB jika berasal dari *junctional stem cells* LRIG1 sekaligus sebagai variabel untuk mengungkapkan sifat antiproliferatif LRIG1 adalah faktor yang

Gambar 26 : PEMERIKSAAN IMUNOHISTOKIMIA YANG POSITIF PADA STEM CELL FOLIKULER DAN INTERFOLIKULER



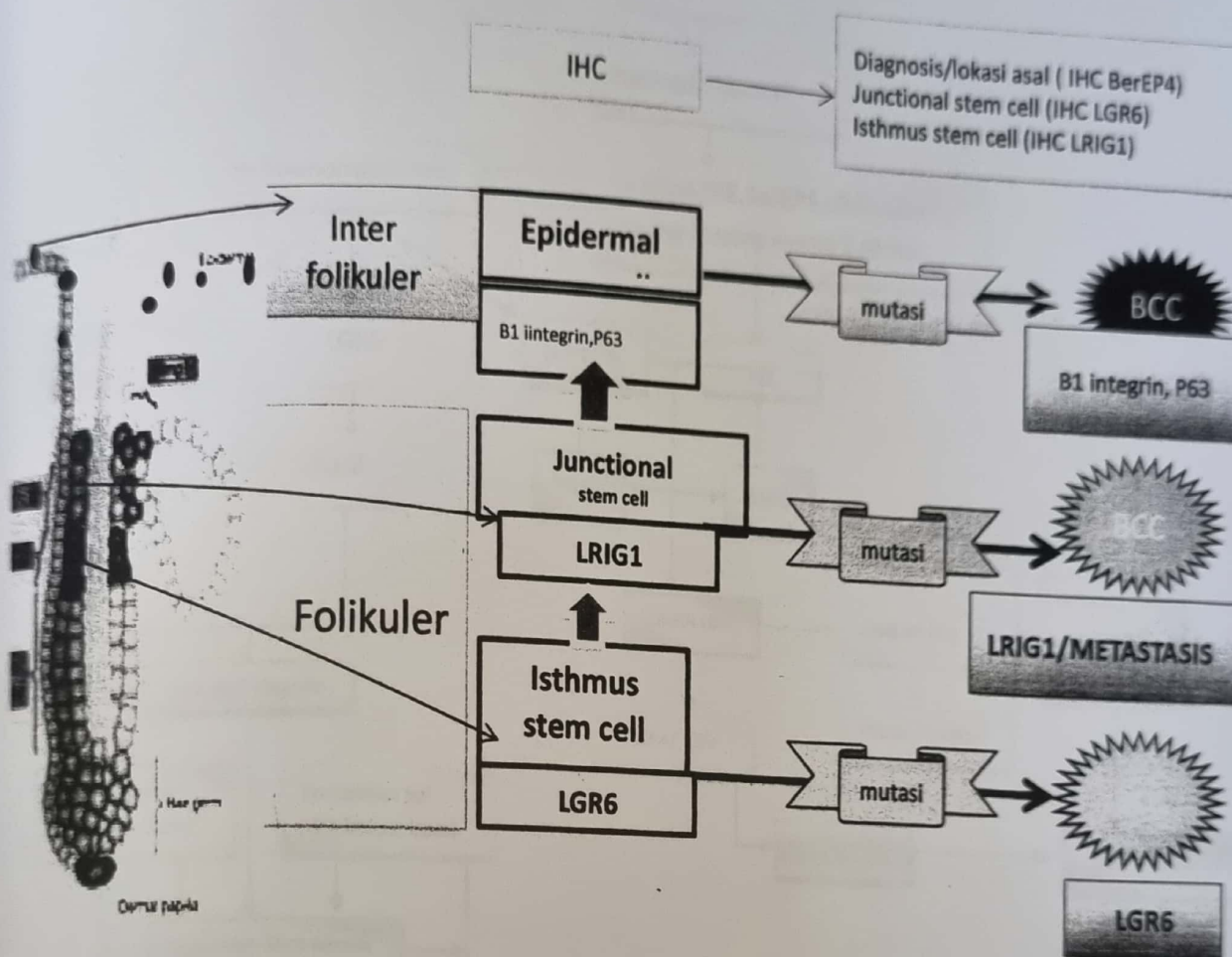
k19	transient amplifying cell	0 – 100% KSB	negatif utk epidermis
k5	k14	diferensiasi sel basal	
k8		sel epithelium	
k1	k10	kornifikasi sel epithelium	
k15		folikuler bulge stem cell	27% KSB
LGR1	JUNCTIONAL STEM CELL		KSB ???
LGR6	central ISTHMUS STEM CELL		KSB ???
BerEp4		84% KSB	

Gambar 26. Beberapa pemeriksaan Imunohistokimia diatas yang digunakan untuk mengidentifikasi stem cell dan bagian dari komponen yang terkait pada kasus-kasus KSB (dalam kotak). khusus untuk LGR1 dan LGR6 belum pernah dilakukan untuk penelitian KSB.

III.B. HIPOTESIS

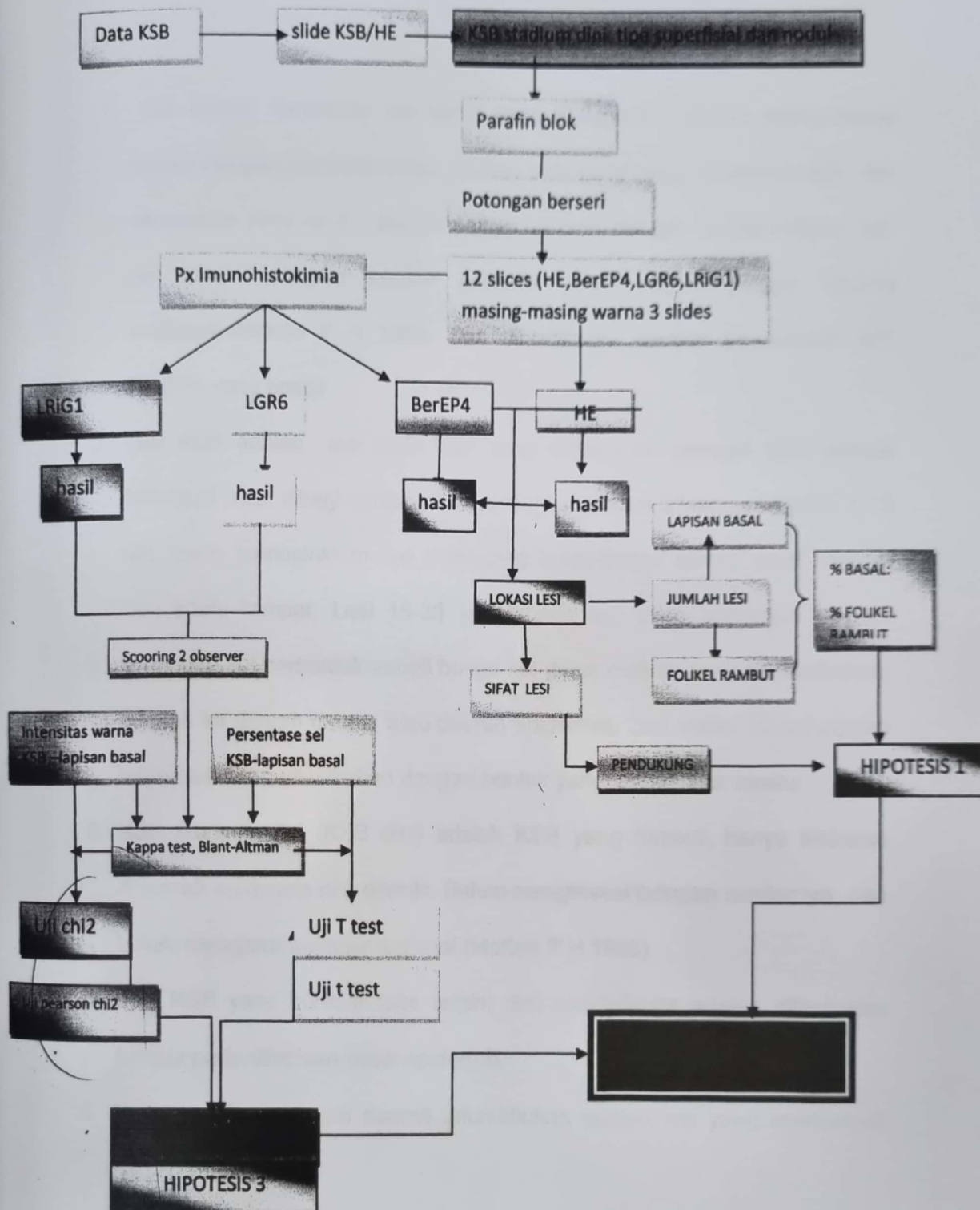
1. Pewarnaan IHK dengan BerEP4 dapat mengidentifikasi lesi dini KSB.
2. Lokasi awal (*site origin*) KSB dini dapat tumbuh pada interfolikuler epidermis dan folikel walau *stem cell origin* berasal dari folikel.
3. *Stem cell origin* KSB dapat berasal dari *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells*
4. KSB dini menunjukkan overekspresi LRIG1 dibanding dengan sel basal epidermis normal.

ERANGKA KONSEP SEL ORIGIN DAN STEM CELL KSB



Gambar 27. Paparan sinar matahari baik yang kronis maupun akut yang menyebabkan mutasi pada stem cell interfolikuler: yaitu *stem cell epidermis*, *stem cell isthmus* sentral maupun *junctional zone* dapat memicu terjadinya KSB. Marker khusus untuk *stem cell junctional zone* adalah LRIG1 dan MTS24, LGR6 untuk *isthmus stem cell* dan BerEP4 untuk mengetahui lokasi sel origin KSB. (Untuk *stem cell epidermis* basal yang positif dengan B1 integrin, P63, involucrin tidak diperiksa dalam penelitian ini). *Stem cell* yang bermutasi diduga sebagai sumber dari KSB. KSB yang berasal dari *stem cell* diharapkan tetap mengekspresi marker protein *stem cell* asal /originnya. Selain itu diduga lokasi mutasi *stem cell* mempengaruhi subtype gambaran patologi dan gambaran klinis KSB

Gambar 28: : DESAIN PENELITIAN



III. D. DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

1. KSB adalah karsinoma sel basal yang didiagnosis secara histopatologi sesuai dengan gambaran khas nukleus oval yang besar, hiperkromatik, dan sitoplasma yang sedikit, bentuk selnya uniform, dengan sedikit mitosis, sel-sel tumor tersusun secara palisade pada bagian pinggir sarang tumornya. (McKee P H 1996) dan dikonfirmasi dengan pewarnaan IHC BerEP4 yang positif.
2. Lesi KSB adalah lesi pada kulit yang didiagnose sebagai KSB sesuai kriteria di atas. dibagi berdasarkan jumlah sel dalam 3 kelompok yaitu 1-15 sel, untuk menunjukkan lesi KSB yang benar-benar sangat awal muncul dari suatu tempat. Lesi 15-30 sel: adalah lesi yang berbentuk seperti kumpulan sel berbentuk seperti bunga kol untuk melihat arah pertumbuhan, apakah ke daerah dermis atau daerah epidermis. Lesi diatas 30 sel adalah menunjukkan pertumbuhan dengan bentuk yang sudah tidak teratur.
3. KSB stadium dini (KSB dini) adalah KSB yang tumbuh hanya terbatas di daerah epidermis dan dermis. Belum menginvasi jaringan sekitarnya, dan belum mengenai kelenjar regional. (McKee P H 1996)
4. Lesi KSB yang berasal (*site origin*) dari interfolikuler adalah ditemukan berada pada lapisan basal epidermis.
5. Lesi yang berasal dari daerah infundibulum adalah lesi yang menempel di daerah infundibulum

6. Lesi KSB yang berasal (*site origin*) dari folikel rambut adalah lesi KSB yang ditemukan berada di daerah ORS folikel rambut
7. Jumlah sampel yang diperhitungkan adalah jumlah lesi didalam setiap preparat (kasus) , jumlah lesi yang dihitung adalah jumlah lesi terbanyak yang terdapat diantara 3 potongan jaringan dalam tiap preparat.
8. Sebagai pembanding kulit normal untuk penelitian ini digunakan kulit yang sama dimana KSB berada, dipilih pada bagian paling jauh dari dari lesi, baik yang sebelah kanan maupun sebelah kiri lesi pada preparat histopatologis
9. Hasil pewarnaan dengan antibodi LGR6 yang dianggap positif adalah sel-sel yang terwarnai (warna coklat) baik pada inti, sitoplasma maupun membran sel oleh pewarnaan *Brown counterstain ultraview DAB kit*.
10. Hasil pewarnaan dengan antibodi LRIG1 yang dianggap positif adalah sel-sel yang terwarnai (warna merah) baik pada inti, sitoplasma maupun membran sel oleh pewarnaan *Red countestain ultraview Alkaline Phosphatase kit*.
11. Gambaran histologi KSB tipe superfisial dengan hilangnya apendiks kulit, terjadi fibrosis pada bagian atas dermis dan serbukan sel radang setempat, dengan pulau-pulau KSB yang khas menempel pada lapisan basal epidermis (Goldberg 1996)

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. DESAIN PENELITIAN

1. Jenis penelitian : penelitian analitik
2. Desain penelitian : *cross sectional*
3. Jenis data : data primer. kategorikal- Ordinal, 2 kelompok berpasangan
4. Uji hipotesis : Uji hipotesis : uji hipotesis perbedaan 2 rerata, perbedaan 2 proporsi, odds ratio, multiple logistik regrestion, uji likeklihood ratio positif dan negatif, validitas, sensitifitas, spesifitas, analisis ROC.
5. Cara analisa data: Data diolah menggunakan program komputer SPSS dan dengan program komputer STATA Versi 10.

B. POPULASI

- a. Populasi target: Semua kasus berupa blok parafin yang didiagnosis KSB stadium dini pada sediaan Patologi Anatomi
- b. Populasi terjangkau : Semua kasus berupa blok parafin yang didiagnosis KSB stadium dini di Healthscope Laboratory-Perth-Australia (Tahun 2010-2011)

C. KRITERIA INKLUSI

1. Semua parafin blok yang sudah terdiagnosis secara histopatologi adalah KSB
2. Jenis KSB stadium dini
3. Parafin blok yang memenuhi syarat untuk pemeriksaan imunohistokimia

D. KRITERIA EKSKLUSI

Sampel yang ditemukan adanya lesi lain selain KSB.

E. JUMLAH SAMPEL / LESI

1. Besar sampel minimal ditetapkan berdasarkan rumus penelitian analitik komparatif kategorik berpasangan 2 kelompok, untuk menentukan lokasi lesi, dengan rumusnya sebagai berikut :

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 SD}{(p1-p2)^2}$$

Dengan menggunakan :

$\alpha=0.05$ sehingga nilai $Z\alpha =1.96$;

$\beta=0.2$ sehingga nilai $Z\beta =0.84$

$SD = 1,42$ (nilai SD lesi KSB)

$p1=0.8$ perentase jumlah KSB pada lapisan basal

$p2=0.2$ presentase jumlah lesi KSB di folikel rambut

$$N = \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 1.42}{(0.8-0.2)^2}$$

$$= \frac{(2.8)^2 \times 1.42}{(0.36)} = 30.924$$

Jadi sampel yang diperlukan untuk mencari lokasi lesi KSB minimal diperlukan 31 lesi.

2. Untuk menghitung hitung sampel lesi untuk menilai karsinogenesis KSB dengan memakai antibodi yang dipakai rumus analitik kategorik berpasangan rumusnya adalah :

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 SD^2}{(p1-p2)^2}$$

Dengan menggunakan :

$\alpha=0.05$ sehingga nilai $Z\alpha =1.96$;

$\beta=0.2$ sehingga nilai $Z\beta =0.84$

$p1=0.97$: persentase kemungkinan kasus yang tidak mengalami metastasis

$p2=0.03$: persentase kemungkinan kasus yang mengalami metastasis

$SD=1.42$ (nilai SD LRIG1 Lesi KSB)

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{(1.96 + 0.84)^2 \times 1.42}{(0.97-0.03)^2} \\
 &= \frac{(2.8)^2 \times 1.42}{(0.8836)} \\
 &= 17.89
 \end{aligned}$$

Jadi sampel yang diperlukan untuk mencari sifat metastasis lesi KSB minimal diperlukan 31 lesi .

F. CARA PENGAMBILAN SAMPEL DAN PEMBUATAN SEDIAAN

1. Sampel diambil dari arsip jaringan blok parafin sebanyak 23 kasus yang sudah didiagnosis KSB stadium dini secara histopatologis di laboratorium *Healthscope – Perth – Australia*,
2. Jaringan dalam blok parafin kemudian dipotong berseri masing-masing sebanyak 12 potongan dan diletakkan pada objek gelas untuk pembuatan sediaan dari sampel, Sediaan-sediaan itu kemudian dibagi menjadi empat kelompok lalu masing-masing kelompok diwarnai dengan HE, IHC untuk BerEP4, IHC untuk LGR6 dan IHC untuk LRIG1

G. TEMPAT PENELITIAN.

1. Pemotongan jaringan dari sampel jaringan KSB pada blok parafin, pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) dan pewarnaan imunohistokimia (IHC) dilakukan di *Healthscope Laboratory-Perth-Australia*.

2. .Diagnosis KSB dini dilakukan di Laboratorium *Healthscope*-Perth-Australia
3. *Scoring* IHK dilakukan di Departemen Patologi Anatomi Fak Kedokteran Unhas-Makassar
4. Analisa statistik dilakukan di departemen penelitian FK-UNTAR Jakarta.

H. KONTROL KUALITAS

- a. Diagnosis histopatologis KSB dilakukan di Perth oleh :

Prof .Dr. Peter Heenan

Dr. Mahmud Ghaznawie, SpPA. Ph.D

- b. Pewarnaan HE dan IHK dilakukan di Perth oleh :

Ms Raelene

Sukmawati Tansil Tan SpKK

- c. *Scoring* IHK dilakukan oleh dua orang:

Dr. Upik Miskad SpPA.PhD

Dr. Husni Cangara. PhD

- d. Analisa statistik dilakukan oleh :

Prof DR.dr. Bambang Sutrisna MsHc(Epid)²⁻³

dr. Sukmawati Tansil Tan SpKK¹

Veli Sungondo,SKM,Msc¹.

- I. PERTIMBANGAN ETIK :** penelitian isudah mendapat persetujuan komite etik dari Fak Kedokteran UNHAS, nomor 0926/H4.8.4.5.31/PP36-kometik/2011

J. KETERBATASAN PENELITIAN

1. Pemotongan serial bukan untuk melihat lesi dari 3 dimensi tapi hanya untuk membandingkan hasil pewarnaan yang berbeda untuk lokasi lesi yang sama.
2. Antibodi LGR6 dan LRIG1 yang digunakan masih baru, dan belum pernah dilakukan pada kasus KSB
3. Antibodi LGR6 dan LRIG1 yang digunakan merupakan antibodi

K. BAHAN, ALAT DAN BIAYA PENELITIAN

1. Parafin blok dan slide sediaan.
2. reagen-reagen :
 - a. Ber- EP4 Ventana Batch # 1106708A
 - b. LGR6 Abcam Batch # GR17865-1
 - c. LRIG1 Abcam Batch # GR44006-2
 - d. Reagen-reagen untuk pemerosesan jaringan dan pewarnaan.
3. Peralatan untuk pemerosesan jaringan, pewarnaan dan mikroskop.

M. JADWAL PENELITIAN

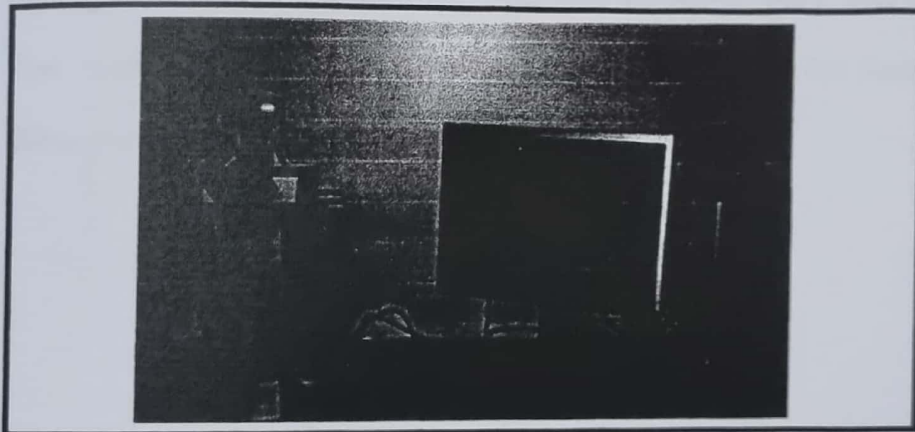
1. Persiapan :
2. Proporsal + izin + komite etik : juni-agustus 2011.
3. .Persiapan alat,bahan: agustus -Oktober 2011.
4. .Pelatihan : November 2011.
5. .Pengumpulan sampel: November – Maret 2012.
6. .*Progress report* : Maret 2012.
7. .Sampelprocessing: Maret – April 2012.
8. .*Data entry* : April 2012.
9. .Menulis laporan : April 2012.
10. .Ujian Hasil : Agustus 2012.
11. .Ujian tertutup : Oktober 2012.
12. .Ujian promosi : November 2012

N. PROSEDUR PENELITIAN

1. Sampel diambil dari jaringan dalam bentuk parafin blok yang memenuhi kriteria inklusi dengan melalui kontrol kualitas.
2. Setiap blok parafin dipotong dengan mikrotom ukuran 4 mikron dan diletakkan pada objek gelas. Sediaan dari tiap kasus di buat 4 (empat) kelompok.
3. Dilakukan pewarnaan HE, IHC BerEP4, IHC LGR6 dan IHC LRIG1 pada masing-masing kelompok sampel.

4. Pewarnaan IHK Ber EP4 dari *Ventana Roche pre-diluted antibody*, *HIER Protease 1 for 4 mins*, antibody at 37C for 16 mins. Diwarnai dengan *Brown counterstain ultraview DAB kit*.
5. Pewarnaan IHK LGR6 ProteinTech 1:100 and 1:50 dilution, *HIER CC1 mild* (buffer pH 8.0 for 30 mins), diwarnai dengan *Brown counterstain ultraview DAB kit*.
6. Pewarnaan IHK LRIG1 Abcam 1:50, *HIER CC2 short*(buffer pH 6.0 for 8 mins). Diwarnai dengan *Red countestain ultraview Alkaline Phosphatase kit*.
7. Kelompok sampel yang diwarnai dengan IHK LGR6 digunakan untuk identifikasi sel-sel yang positif dengan LGR6. Demikian juga dengan kelompok sampel yang diwarnai dengan IHK LRIG1 digunakan untuk identifikasi sel-sel yang positif dengan LRIG1.
8. Sebagai pembanding untuk ekspresi LGR6 dan LRIG1 pada lesi KSB dini digunakan ekspresi kedua biomarker ini pada sel-sel basal epidermis normal yang berada di pinggir sediaan dari kulit yang sama
9. Pemeriksaan hasil pewarnaan IHK dilakukan 2(dua) orang secara terpisah. dengan sistem scoring berdasar pada intensitas warna dan persentase sel yang terwarna., Untuk melihat konsistensi dan realibiitas hasil penilaian 2 orang tersebut maka hasil dari kedua pemeriksa diuji dengan metode Kappa dengan hasil dapat diterima (konsisten dan *reliable*).

10. Semua kelompok sampel sesudah dilakukan observasi mikroskopis dilanjutkan dengan pemotretan menggunakan mikroskop Olympus FS XP 10. Pemotretan dilakukan untuk satu sediaan sampel secara utuh, lalu tiap-tiap lesi, dari sebelah kiri sampai lesi terakhir disebelah kanan.
11. Foto-foto dari lesi yang identik antara pewarnaan HE dan IHC BerEP4 disandingkan untuk melihat kehandalan kedua pewarnaan itu untuk diagnosis KSB. Demikian juga dengan pewarnaan IHC LGR6 dan IHC LRIG1 untuk melihat sel-sel KSB yang terwarna dengan kedua biomarker itu

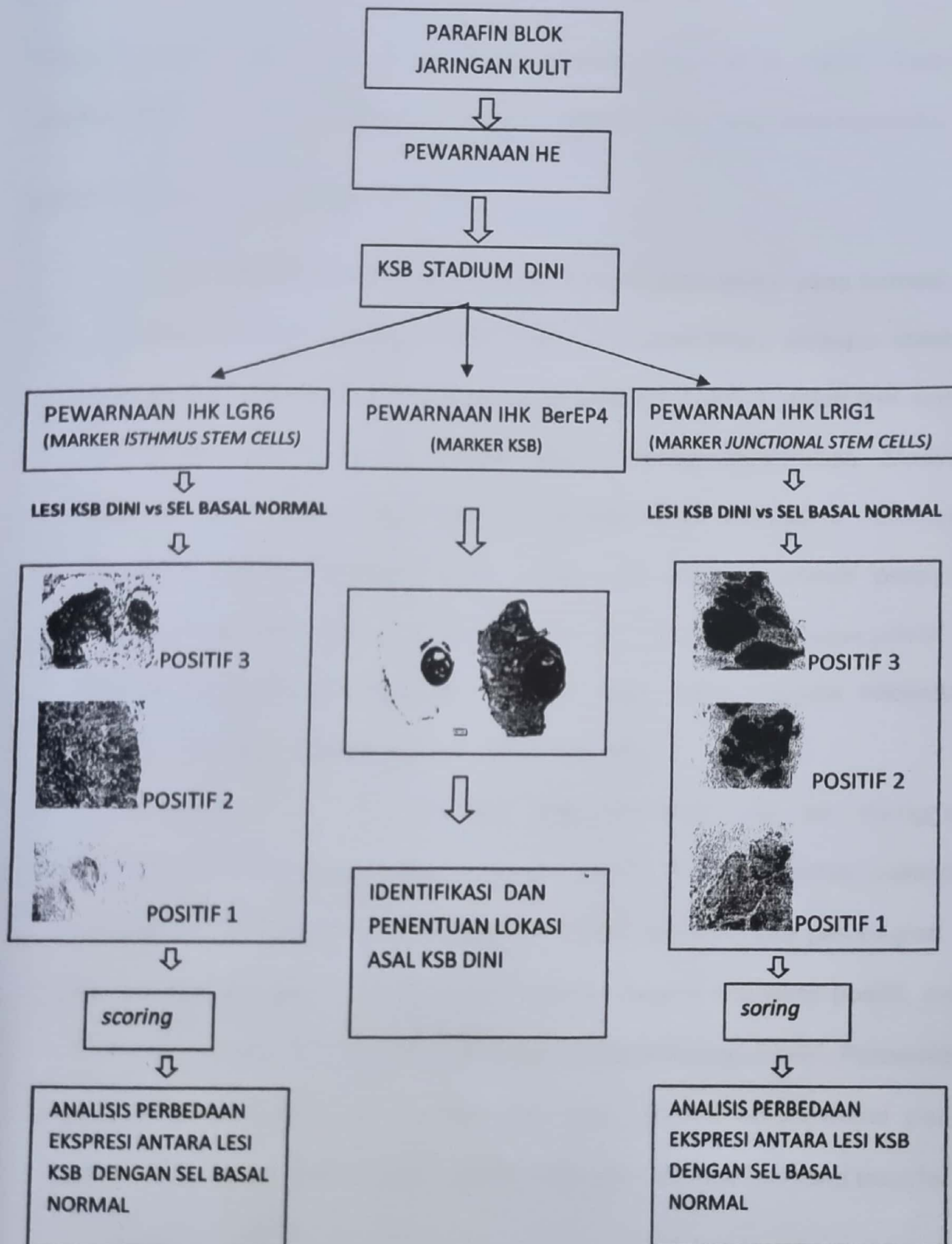


Gambar 20 : Microscope Olympus FX XP 10

12. Hasil pewarnaan IHC BerEP4 dievaluasi warnanya dan dibandingkan dengan HE, dinilai intensitas warna dan persentasi warna, batas lesi, lokasi lesi pada daerah basal, infundibulum, interfolikuler, folikel rambut, jumlah sel dalam tiap lesi 1-15 sel, 15-30 sel, lebih dari 30 sel.

13. Hasil pewarnaan dengan IHK LGR6, karena IHK Lgr6 merupakan antibodi yang masih baru ditemukan pada tahun 2010 (Sellheyer and Krahl 2010) dan baru pertama kali digunakan untuk preparat KSB. Maka hasil warnanya dinilai dengan cara : dilihat secara keseluruhan 23 preparat, dilihat intensitas warna yang paling tinggi dan paling rendah, lalu dibagi menjadi 3 kelompok intensitas warna. Demikian juga berlaku untuk IHK LRIG1.
14. Terakhir dilakukan *scoring* untuk IHK LGR6 dan LRIG1 pada daerah lesi dan daerah basal epidermis dari bagian terluar dari pinggir lesi. *Scoring* IHK dilakukan oleh 2 *observer* yang terlatih, berpengalaman dan bersertifikat di bidang IHK secara terpisah, dr. Upik Miskad. SpPA. PhD, dan dr. Husni Phd. Lalu hasil penilaian oleh 2 *observer* akan dilakukan tes Kappa untuk dilihat konsistensi hasil penilaian tersebut.

O. Gambar 30: PROSEDUR PEMERIKSAAN HE, IHK LGR6, BerEP4, DAN LRIG1



P. Cara *scoring* pada pemeriksaan pewarnaan IHK

Sistim *scoring* (Diest, Dam et al. 1997; Adams, Green et al. 1999; Stefano, Zannoni et al. 2011), dilakukan berdasarkan sistim *scoring* yang telah digunakan peneliti sebelumnya. sebagai berikut:

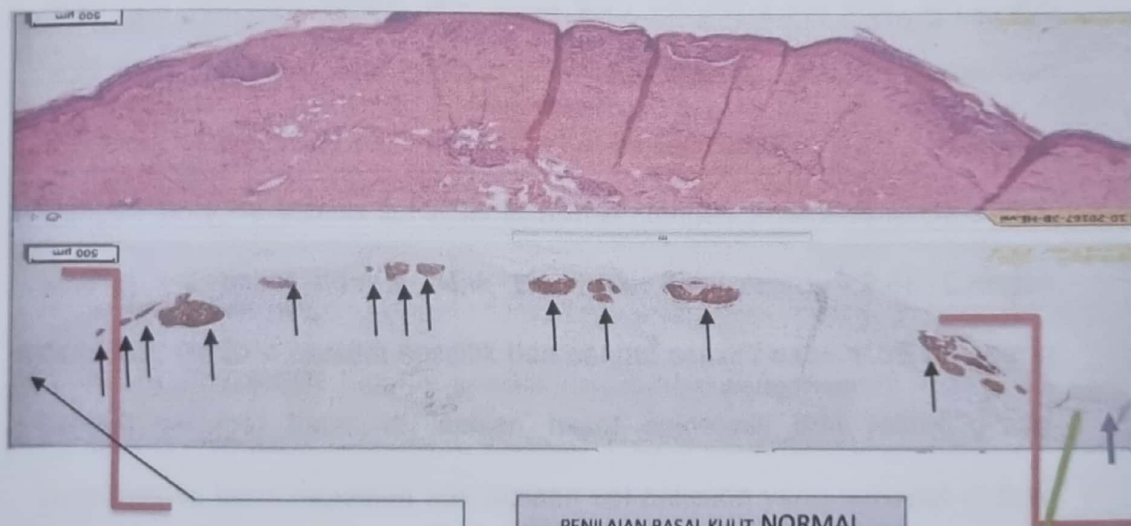
1. *Scoring* dilakukan oleh 2 *observer* yang berbeda pada waktu yang berbeda.
2. Sebelum dilakukan *scoring*, kedua *observer* menyamakan persepsi terlebih dahulu mengenai intensitas warna untuk positif 1,2,dan 3. untuk IHK untuk LGR6 dan LRIG1, semua preparat dilihat secara keseluruhan. Masing-masing jenis IHK yang positif, ditetapkan untuk menjadi 3 kelompok intensitas warna. Intensitas yang paling kuat diantara semua preparat ditetapkan sebagai positif 3, yang paling lemah, ditetapkan sebagai positif 1, dan yang dengan intensitas diantaranya, digolongkan sebagai intensitas sedang, dan yang tidak terwarnai, diberi nilai nol.
3. Untuk menentukan persentasi lesi yang terwarnai, satu lesi dianggap sebagai 100%, dengan batas susunan sel-sel KSB berbentuk palisade sebagai batas pinggir lesi. penilaian persentasi berdasarkan pembagian 1 lesi menjadi 10 bagian, dinilai sesuai berapa bagian lesi yang positif, dan ditafsirkan secara semikuantitatif berapa % tiap lesi yang positif. Persentasi jumlah lesi dinilai secara berurutan dari lesi pertama yang didapat pada sebelah kiri, dilanjutkan dengan sebelah kanan, sampai lesi yang terakhir.

4. Penilaian terhadap sel basal normal dilakukan pada daerah paling pinggir dari sediaan pada tiap preparat. Dilakukan dengan cara menghitung 10 sel basal dari bagian paling luar dari sediaan, dinilai dari sebelah kiri maupun sebelah kanan. Pada sel ke 11 dan sel ke 20, ditarik lurus garis imajinasi ke atas sampai lapisan stratum korneum epidermis. Daerah kotak tersebut dianggap 100%, masing-masing sel basal ditarik garis imajinasi seperti pada sel basal pertama dan ke 10, setiap satu kotak diantara 2 garis imajinasi sel basal dianggap 10%, dengan total 100%. (gambar 31-32)
5. Sesudah mendapatkan persepsi penilaian yang sama antara 2 *observer*, selanjutnya kedua *observer* akan menilai hasil IHK tersebut secara terpisah.
6. Preparat diberi nomor 1 sampai 23 pada kiri bagian atas, pewarnaan LGR6 dan LRIG1, dengan memperhatikan posisi lapisan epidermis dibagian atas
7. Preparat diletakkan dalam posisi bagian nomor disebelah kiri menghadap keatas
8. Preparat LGR6 dan LRIG1 dilihat secara keseluruhan untuk di evaluasi hasil pewarnaan biomarker itu pada jaringan dengan lesi KSB dan pada jaringan normal.
9. Dilakukan pemotretan preparat dengan mikroskop virtual dengan memakai program Olyvia, dengan pembesaran standar 10x40. Di foto untuk 1 preparat utuh, kemudian dilanjutkan untuk foto tiap-tiap lesi KSB yang ada pada preparat, diurut dari sebelah kiri berakhir di sebelah kanan

10. Lakukan scoring seperti keterangan no 2 diatas
11. Hasil positif persentasi ini dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Yaitu nol untuk yang negatif, positif 1 = kurang dari 20%, positif 2 = 21 – 49,9%. Positif 3 = 50 – 79,9 % , positif 4 = > 80%
12. Hasil dari pemeriksaan immunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarna dan intensitas dari pewarnaan, sebagai berikut:
 - a. Intensitas warna dikelompokkan menjadi 4 kelompok : 0= tidak terwarnai antibodi, 1=positif lemah, 2=positif sedang, 3=positif kuat
 - b. Persentase sel yang terwarnai dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu : 0 = tidak ada sel KSB yang terwarnai, <20% = positif 1. 21- 49,9% = positif 2, 50-79,9% = positif 3, > 80% = positif 4
13. Ekspresi mencakup intensitas dan persentase kemudian digabung menjadi score IHK akhir yang juga dikelompokkan atas 4 kelompok yaitu tidak terekspresi, eksprese lemah, ekspresi sedang dan ekspresi kuat. Dengan ketentuan yaitu bila hasil penjumlahannya nol = tidak terekspresi, bila penjumlahannya 1-3 : ekspresi lemah, bila 4-5- = ekspresi sedang, dan bila 6-7 = ekspresi kuat.
14. Jika hasil Uji Kappa < 0,4 maka hasil tersebut akan diulang, dan diminta kedua observer mendiskusikan ulang kriteria penilaiannya.
15. Sesudah memenuhi syarat uji kappa tes, maka hasil scoring akan dianalisis sesuai tujuan penelitian.



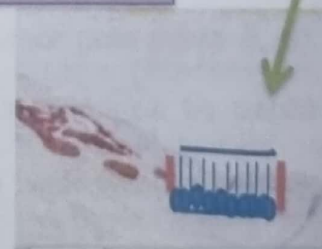
Gambar 31 : Tanda panah menunjukkan lesi KSB, setiap lesi dianggap 100% dengan batas lesi sel-sel KSB tersusun palisade sebagai ciri khas KSB.



Gambar 32 : Tanda panah menunjukkan tepi lesi yang akan diambil sebagai pembanding lapisan basal normal epidermis. dapat diambil dari sebelah tepi lesi paling kiri maupun paling kanan

PENILAIAN BASAL KULIT NORMAL

Sel ke 11-20



BAB V

HASIL PENELITIAN

A. Deteksi KSB dini dengan HE dan IHK BerEP4.

Pada pewarnaan HE lesi KSB dini tampak sebagai proliferasi sel basaloid di lapisan basal epidermis yang masuk ke dermis superfisial. Pada umumnya lesi dini ini bisa dideteksi dengan pewarnaan HE. Namun ada beberapa lesi KSB sangat dini, yang baru beberapa sel saja, terkadang agak sulit dideteksi pada sediaan yang diwarnai HE. Dengan pewarnaan IHK BerEP4 lesi yang baru beberapa sel ini terlihat jelas (foto mikro 1-3). Dengan BerEP4 semua sel KSB terwarnai dengan intensitas yang sama, sedang sel basal normal tidak terwarnai (foto mikro 1,2,4). Dengan demikian, BerEP4 bersifat spesifik dan sangat sensitif untuk KSB dini yang tumbuh sebagai tunas di lapisan basal epidermis dan folikel. Pada penelitian ini kami dapatkan ada lapisan sel palisade yang terdapat di luar lesi KSB yang tidak terwarnai BerEP4. Ini berarti pada lesi dini KSB lapisan sel palisade belum tentu merupakan bagian dari tumor (foto mikro 5, 6). Pertumbuhan tunas KSB mempunyai sifat khas, yakni masuk ke papila dermis (dermis superfisial). Bagian dermis di bawah tunas KSB ini tampak

pemadatan, sedang lapisan sel epidermis di atasnya tidak menunjukkan perubahan struktural (foto mikro 7,8, 9,10).

B. Identifikasi lokasi asal tunas KSB dini

Dari penelitian ini tampak bahwa sebagian besar tunas KSB tumbuh dari lapisan basal epidermis interfolikuler (380 lesi) dan sebagian kecil saja yang tumbuh di infundibulum folikel rambut (14 lesi) (tabel 1). Ukuran lesi bervariasi dari yang paling kecil dengan jumlah sel <15 sel sampai >30 sel. Tunas KSB ini tumbuh secara random dimana jarak satu tunas KSB dengan tunas sebelahnya tidak menentu (foto mikro 4 dan 11). Selain tumbuh di basal epidermis interfolikuler, KSB bisa juga tumbuh di infundibulum folikel rambut (foto 3, 12, 11, 13). Lesi-lesi dini KSB yang pada sediaan HE tidak mudah dipastikan, tapi dengan IHK BerEP4 tampak jelas terwarnai sehingga bisa diyakini bahwa lesi itu adalah KSB, sebab pada infundibulum folikel rambut normal dan lapisan basal epidermis normal tidak tampak ada sel yang terwarnai dengan IHK BerEP4. (foto mikro 3, 11, 12).

Pada lesi yang tumbuh ke dalam dermis, tampak lesi-lesi di dalam dermis mempunyai kecenderungan untuk menyatu menjadi lesi yang lebih besar (foto 4, 8, 10), dan walaupun lesi tumbuh ke dalam dermis, lesi-lesi tersebut tetap tidak terlepas dari lapisan basal epidermis (MBZ) (foto mikro 4, 7, 9, 10, 13). Pada daerah dermis yang terdapat lesi KSB tampak serbukan sel-sel radang lebih padat dibanding tanpa lesi KSB (foto 9, 10)

C. Identifikasi *stem cell origin* pada KSB dengan IHK LRIG1 dan IHK LGR6

Pada pemeriksaan IHK LRIG1 menunjukkan ekspresi dengan LRIG1 pada lesi-lesi KSB (foto mikro 14), positifitas tersebut semakin nyata pada daerah tengah lesi dibanding dengan tepi lesi (foto mikro 14.a), demikian juga untuk lesi tipe nodul positifitasnya lebih kuat dibanding yang non nodul (foto mikro 13.C). Lesi-lesi KSB menunjukkan ekspresi lemah sampai kuat dengan LGR6 (foto mikro 13, 16, 17), dimana ekspresi kuat terlihat daerah tengah lesi dibanding dengan tepi lesi (foto mikro 17),

Tabel 1. Jumlah lesi KSB dini berdasar lokasi asal, jumlah sel per lesi dan pembentukan nodul berdasar pewarnaan BerEP4

Keterangan	Lokasi /	N (lesi)	Persen
Lokasi asal	Interfolikulerl	380	96.45
	Folikel	14	3.55
	Interfolikuler <15 sel	22	5.58
	Interfolikuler 16-30 sel	33	8.38
	Interfolikuler >30 sel	325	82.49
Jumlah sel perlesi	Folikel Rambut ≤15	9	2.28
	Folikel Rambut >15	5	1.27
	Non-nodul	377	95.69
Bentuk	Nodul	17	4.31

Penemuan adanya ekspresi LGR6 pada lesi KSB dapat dijadikan bukti bahwa lesi KSB berasal dari mutasi *isthmus stem cell* yang terletak di atas *bulge stem cell*, sel mutan kemudian berpindah ke daerah *junctional* lalu ke infundibulum dan terakhir berada di lapisan basal epidermis. Demikian juga adanya ekspresi LRIG1 pada lesi KSB dapat dijadikan bukti bahwa lesi KSB bias pula berasal dari *junctional stem cells* yang setelah mutasi bermigrasi juga ke atas sampai ke lapisan basal interfolikuler epidermis. Hipotesis tentang migrasi sel-sel mutan ke epidermis dari folikel sesuai dengan temuan pada pewarnaan IHC BerEP4 dimana terlihat kebanyakan lesi KSB bertebaran (multifokus) di lapisan basal interfolikuler epidermis. Pada penelitian ini ditemukan pula lesi-lesi KSB bukan hanya di daerah interfolikuler, tetapi berada juga pada daerah folikel rambut bagian atas (*upper part hair follicle*), yaitu daerah *isthmus stem cell*, *junctional stem cell* (foto mikro 3, 11, 12, dan 13). Temuan ini memperkuat dugaan sebagaimana yang menjadi hipotesis penelitian ini, bahwa sel-sel mutan pada *isthmus stem cell* dan *junctional stem cell* bukan hanya bermigrasi ke epidermis menjadi *epidermis stem cells* dan mulai bertumbuh menjadi KSB di interfolikel epidermis tetapi masing-masing dapat tumbuh menjadi KSB di tempat asalnya yaitu di folikel.

LRIG1 dan LGR6 positif juga pada lapisan basal normal dan beberapa sel-sel suprabasal epidermis (foto mikro 15.B, 16.A) menandakan bahwa *stem cell* normal dari folikel yang bermigrasi menjadi epidermal cells tetap mengekspresikan kedua marker ini.

D. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan KSB sehingga digolongkan *low grade carcinoma* dan jarang metastasis.

Pada penelitian ini ditemukan bahwa memang terjadi overekspresi LRIG1 dan LGR6 pada lesi KSB jika dibandingkan dengan ekspresi kedua marker tersebut pada sel basal normal (Tabel: 2). Overekspresi ini yang secara visual sudah kelihatan dari tingginya intensitas warna *imunostaining* dari kedua marker tersebut pada lesi KSB makin diperkuat oleh hasil *Mann-Whitney U test* dimana perbedaan ekspresi kedua marker tersebut pada lesi KSB berdasarkan scoring intensitas warna dan prosentase sel yang terwarna sangat signifikan ($p=0.000$) dibandingkan dengan ekspresinya pada sel basal normal (Table: 3)

Oleh karena LRIG1 berfungsi sebagai antiproliferasi pada stem cells maka kemungkinan besar fungsi ini tetap diperankannya terhadap sel-sel KSB sehingga kuat kemungkinan bahwa overekspresi LRIG1 inilah yang membuat kemampuan proliferasi sel KSB lemah sehingga digolongkan dalam *low grade carcinoma* dan selanjutnya menjadi kanker yang jarang bermetastasis. Sedangkan overekspresi LGR6 pada lesi KSB belum dapat diperkirakan kontribusinya terhadap pertumbuhan KSB masih diperlukan penelitian tentang fungsi LGR6 yang bisa dikaitkan kepada kemampuan proliferasi sel-sel KSB.

Tabel 2: Overekspresi LGR6 dan LRIG1 pada lesi BCC (n=394) dibanding dengan ekspresi keduanya pada sel basal normal epidermis dengan pewarnaan imunohistokimia.

Kategori ekspresi	Observer I		Observer II	
	N	Persentase	N	Persentase
LGR6 Lesi KSB				
0	4	1.02	0	0
1 sd 3	0	0	0	0
4 sd 5	101	25.63	102	25.89
6 sd 7	289	73.35	292	74.11
LGR6 sel-sel Basal normal				
1 sd 3	23	100	23	100
LRIG1 Lesi KSB				
0	26	6.6	26	6.6
1 sd 3	2	0.51	3	0.76
4 sd 5	177	44.92	179	45.43
6 sd 7	189	47.97	186	47.21
LRIG1 sel-sel Basal normal				
0	3	13.04	5	21.74
1 sd 3	20	86.96	18	78.26

- kategori 0 "Tanpa ekspresi"
- kategori 1 - 3 "Ekspresi lemah"
- kategori 4 - 5 "Ekspresi sedang"
- kategori 6 - 7 "Ekspresi kuat"

Tabel 3: Mann-whitney U test LGR6 dan LRIG1 pada sel-sel Basal normal dengan Lesi KSB

Variabel	n	Mean $\pm$ SD	Min/Max	P value
LGR6				
LGR6 Basal	23	1.34 $\pm$ 0.48	(1/2)	0.0000*
LGR6 Lesi KSB	394	5.95 $\pm$ 0.97	(0/7)	
LRiG1				
LRiG1 Basal	23	1.04 $\pm$ 0.63	(0/3)	0.0000**
LRiG1 Lesi KSB	394	5.37 $\pm$ 1.66	(0/7)	
* Mann-Whitney U Test LGR6 Lesi KSB vs LGR6 sel Basal normal				
** Mann-Whitney U Test LRiG1 Lesi KSB vs LRiG1 sel Basal normal				

FOTO-FOTO HASIL PENELITIAN

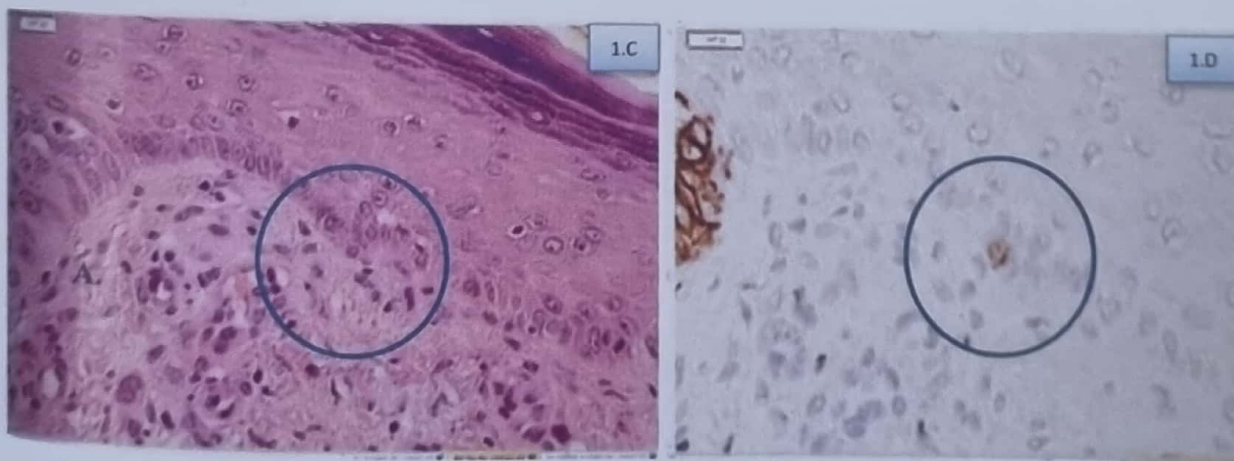


Foto 1: Dengan pewarnaan HE (gambar 1A,1C), bagian yang dilingkari tidak terlihat jelas adanya lesi KSB. Dengan pewarnaan IHC BerEP4 (gambar 1B, 1.D) terlihat lesi KSB yang sangat kecil berasal dan terdapat di lapisan basal epidermis, sementara sel basal normal tidak terwarnai dengan IHC BerEp4.



Foto2: Tunas KSB terlihat mulai tumbuh di ujung rete-ridge epidermis terdeteksi dengan IHK BerEP4 (gambar 2.B). Tunas ini tidak terdeteksi pada pewarnaan HE (gambar 2A).

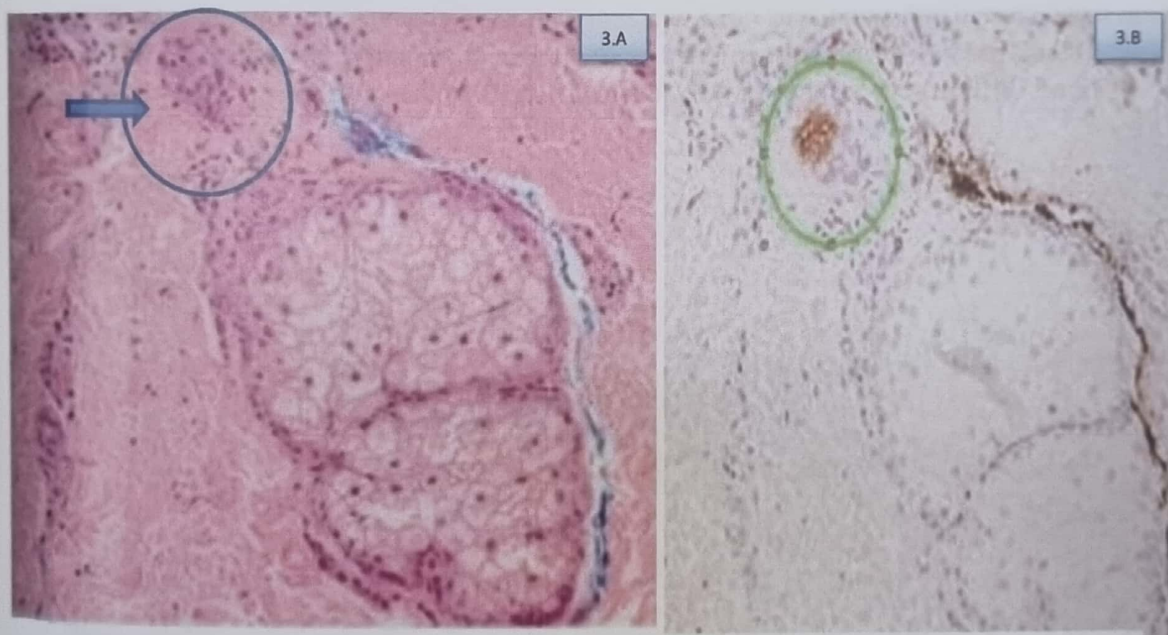


Foto 3: Tunas KSB tumbuh di pangkal kelenjar sebacea (*junctional zone*). Dengan pewarnaan HE (gambar 3.A) tunas ini tidak terlihat jelas, tapi pada pewarnaan IHK BerEP4 (gambar 3.B) lesi terlihat jelas.

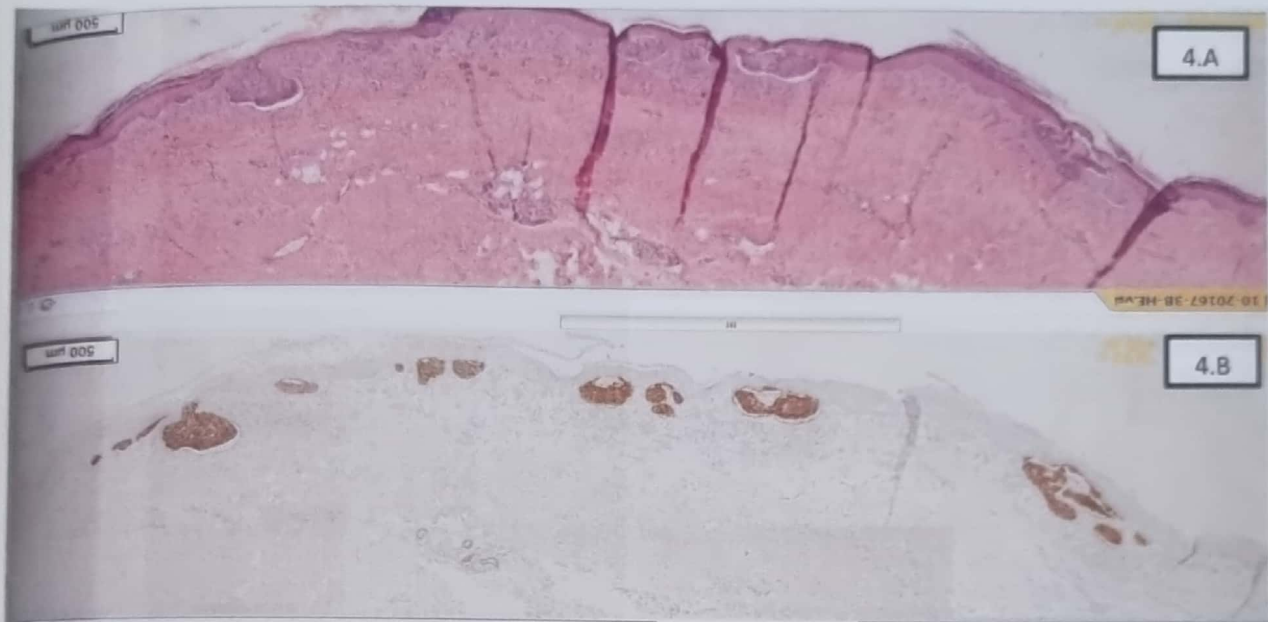


Foto 4: Berbagai macam ukuran lesi KSB yang berasal dari basal epidermis bertebaran di sepanjang lapisan basal epidermis, yang tumbuh ke arah dermis dan tetap tidak lepas dari lapisan basal epidermis, terdapat lesi KSB di sebelah kanan yang menunjukkan beberapa lesi dari KSB menyatu membentuk lesi yang lebih besar (4A). Lesi sangat dini KSB terlihat lebih jelas dengan pewarnaan IHK BerEP4

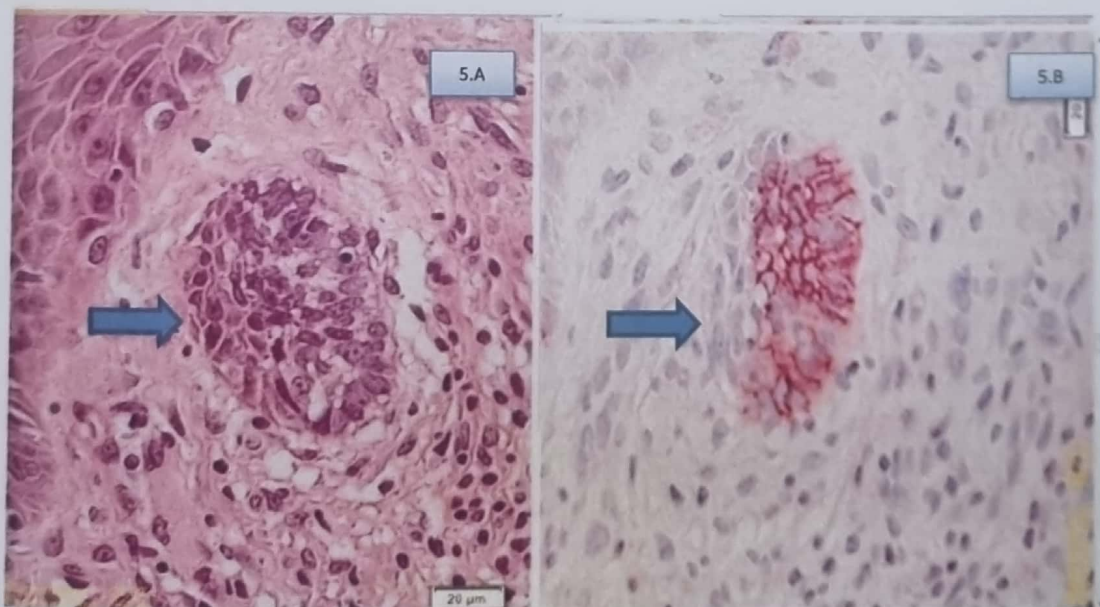


Foto 5: Sekelompok sel dengan inti hiperkromatik, mitosis aktif tersusun rapi, berasal dari basal epidermis tumbuh "budding down" ke dermis. Dengan Pewarnaan IHK BerEP4 ekspresi kuat menunjukkan sel-sel KSB, pewarnaan dengan Alkaline phosphatase (merah), terlihat daerah sel-sel palisade yang normal terdorong oleh pertumbuhan sel ke dermis, dan tidak terwarnai oleh IHK BerEP4. (5.B). Terlihat serbukan sel – sel radang di sekitar lesi KSB

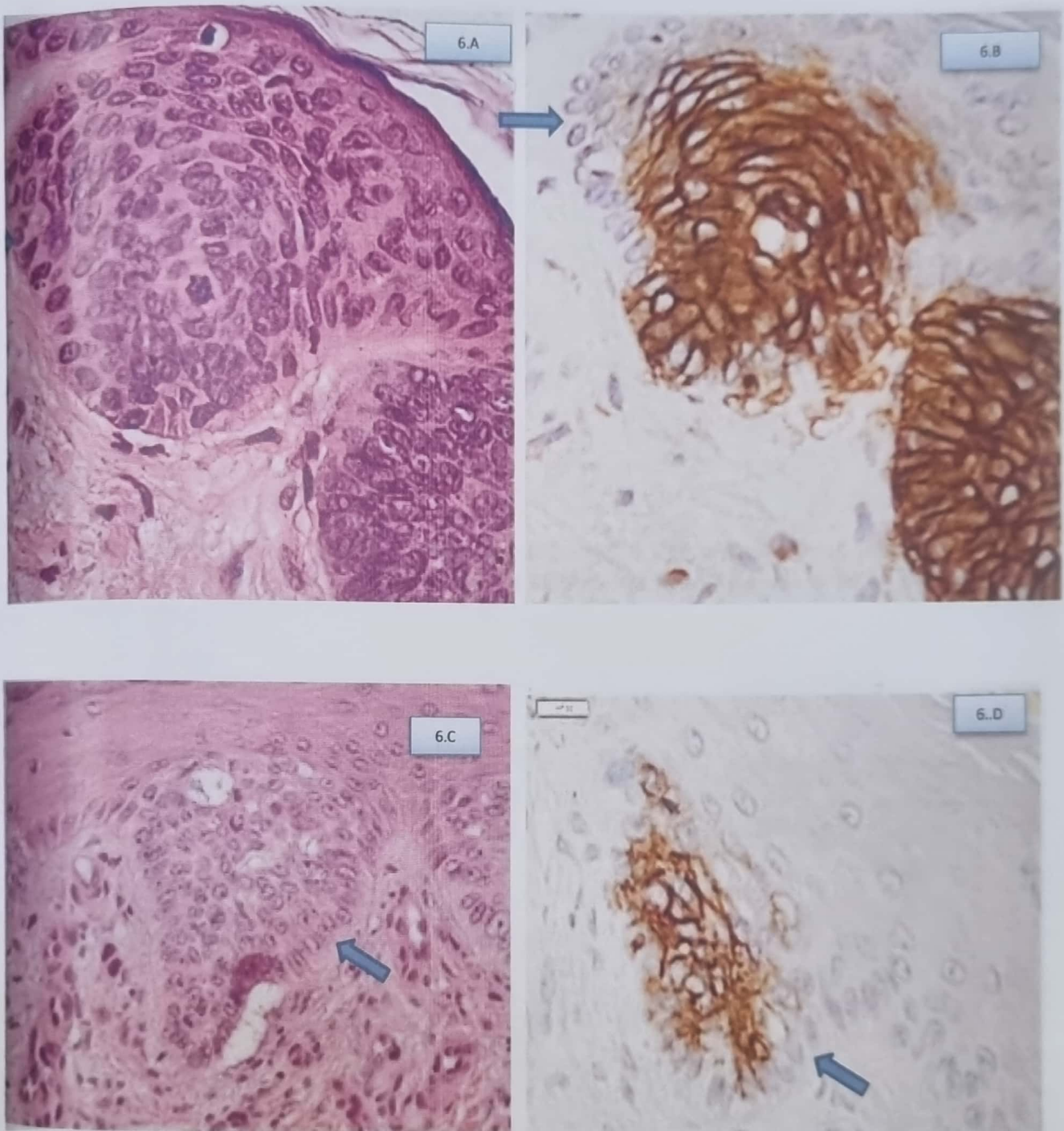


Foto 6: Pewarnaan HE pada lesi KSB dini (6.A, 6.C), dengan ciri khas sel-sel palisade yang mengelilingi sekelompok sel monomorf hiperkromatik dan aktif bermitosis (tanda panah). Pada pewarnaan IHK BerEP4 yang selalu positif dengan sel-sel KSB, menunjukkan sel-sel palisade yang tidak terwarnai oleh IHK BerEP4, sel palisade seperti sel normal basal epidermis disekitarnya

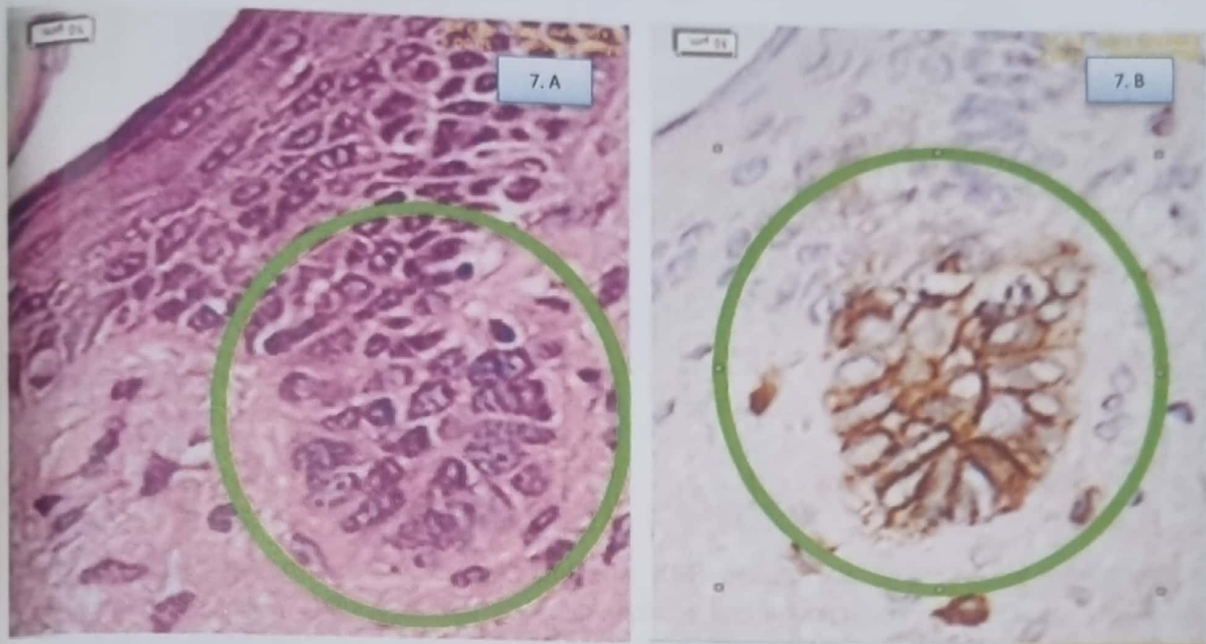


Foto 7: Sekelompok sel dengan inti hiperkromatik, mitosis aktif tersusun rapi, berasal dari basal epidermis tumbuh " budding down" ke dermis. Dengan Pewarnaan IHK BerEP4 ekspresi kuat menunjukkan sel-sel KSB (7. B)

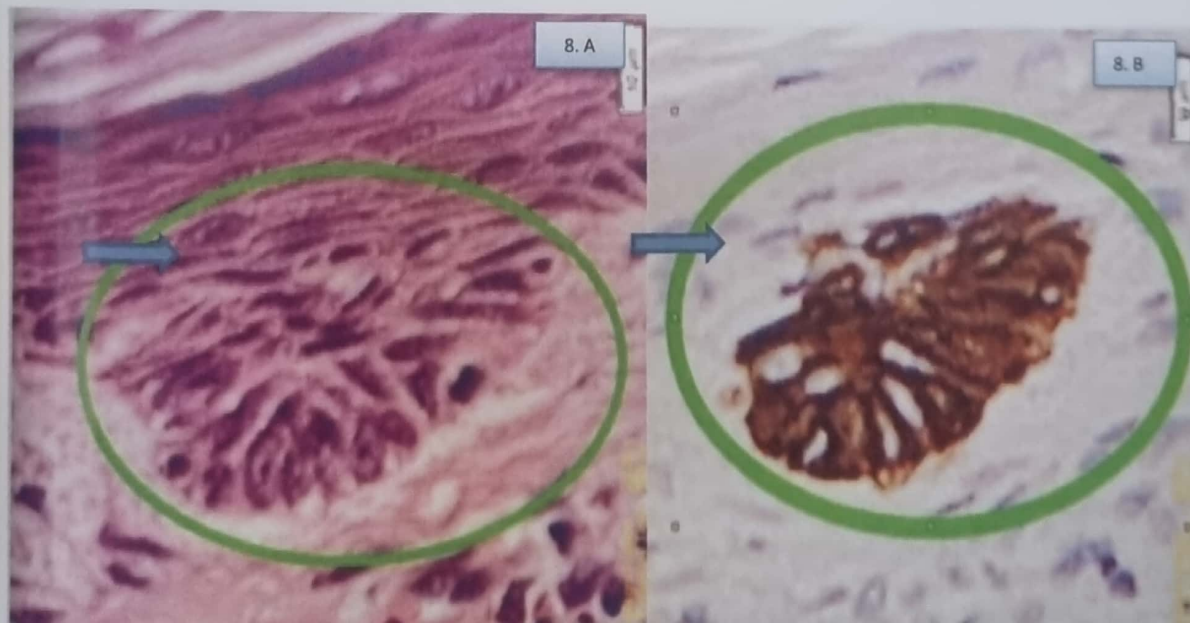


Foto 8 : Sekelompok sel dengan inti hiperkromatik, mitosis aktif tersusun rapi, berasal dari basal epidermis tumbuh " budding down" ke dermis. Dengan Pewarnaan IHK BerEP4 ekspresi kuat menunjukkan sel-sel KSB (8.B)

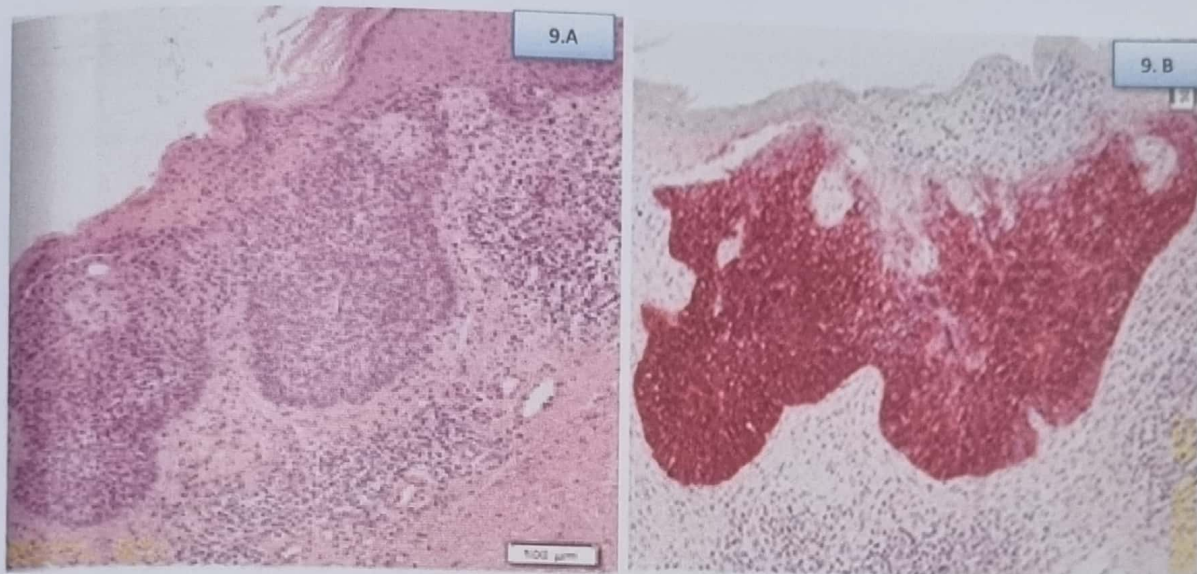


Foto 9: Pada pewarnaan HE tampak dua lesi KSB dengan ciri khas sel-sel monomorf dikelilingi oleh sel-sel palisade, berasal dari lapisan basal epidermis tumbuh ke dalam dermis (9.A), pada potongan jaringan berikutnya yang diwarnai dengan IHC BerEP4 (merah) menunjukkan terjadigabungan dari kedua lesi, membentuk lesi yang lebih besar, walaupun sudah tumbuh membesar ke dalam dermis, namun tetap berhubungan dan tidak lepas dari lapisan basal epidermis (9.B). Pada bagian mesenkim sekitar lesi terlihat serbukan sel-sel radang padat dan jaringan kolagen yang lebih padat.

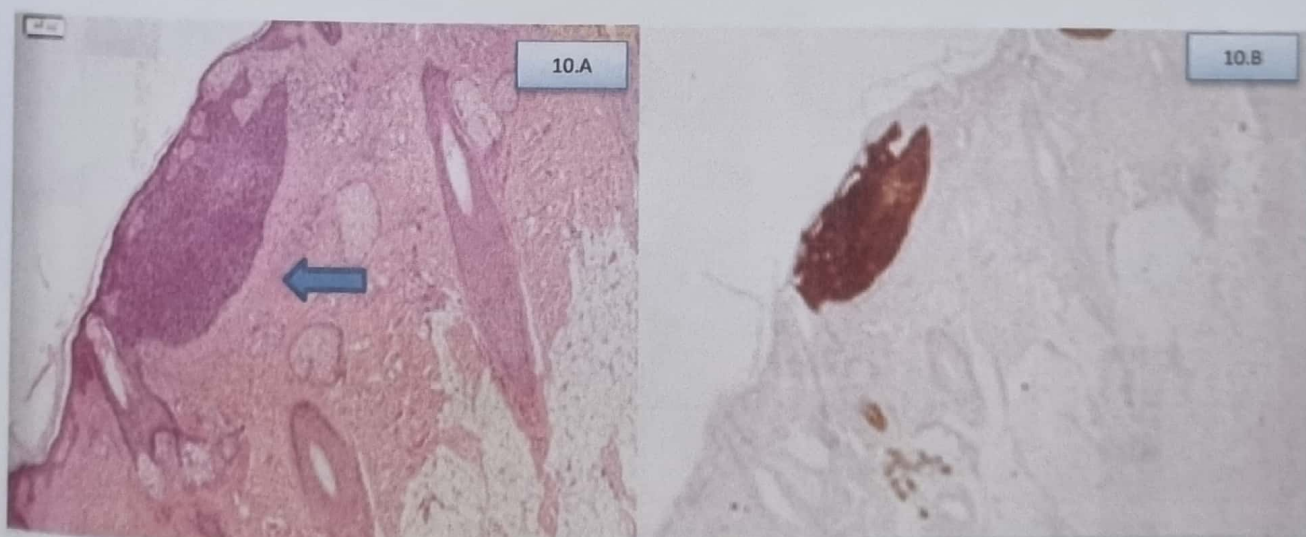


Foto 10: Pada pewarnaan HE (10.A) terlihat lesi-lesi KSB yang membesar tumbuh ke dalam dermis, terlihat pada bagian basal epidermis, terdapat beberapa asal pertumbuhan yang tetap tidak lepas dari lapisan basal epidermis, menunjukkan gabungan dari beberapa lesi KSB menyatu membentuk lesi yang lebih besar. Terlihat serbukan sel-sel radang dan jaringan kolagen yang lebih padat di sekitar lesi di banding dengan daerah tanpa lesi (tanda panah). Pada pewarnaan dengan IHC BerEP4 lesi KSB menunjukkan ekspresi yang kuat

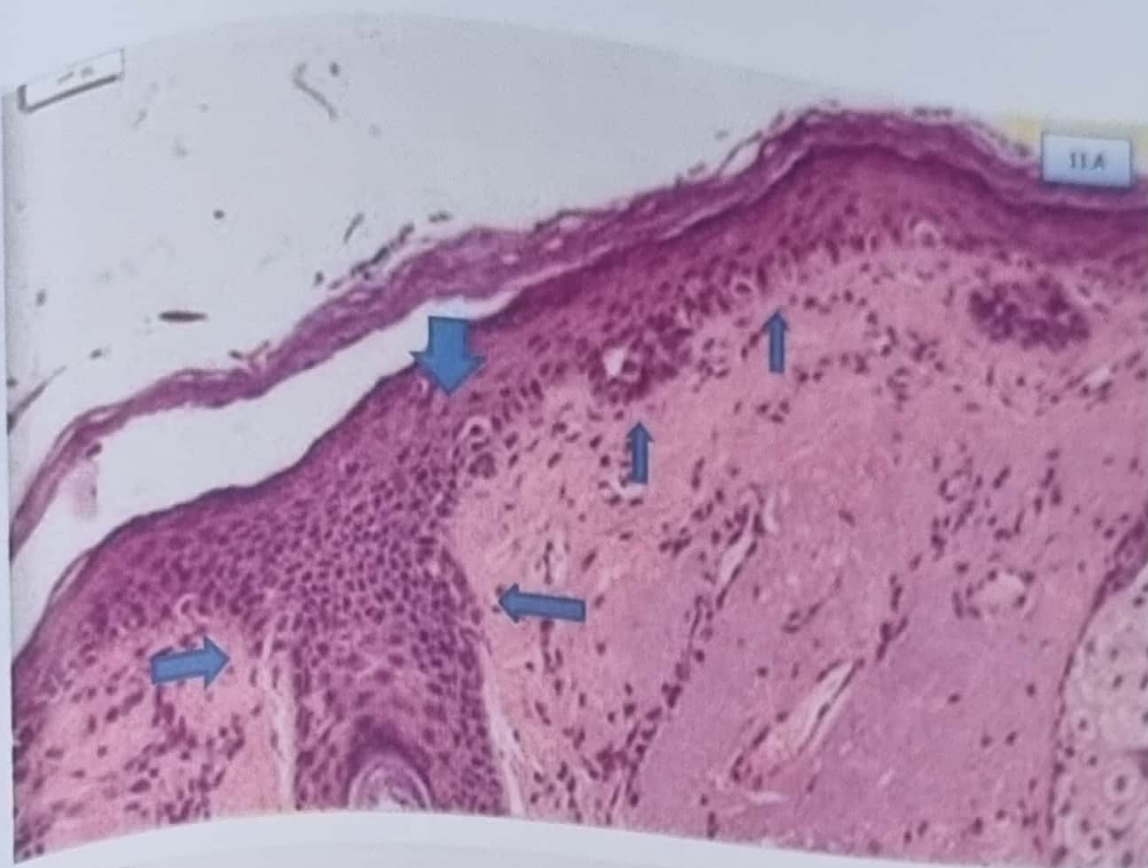


Foto 11: lesi-lesi KSB berasal dari daerah infundibulum folikel rambut dan juga daerah basal epidermis (11.A), terlihat lebih jelas dengan pewarnaan IHC BerEP4 (11.B)

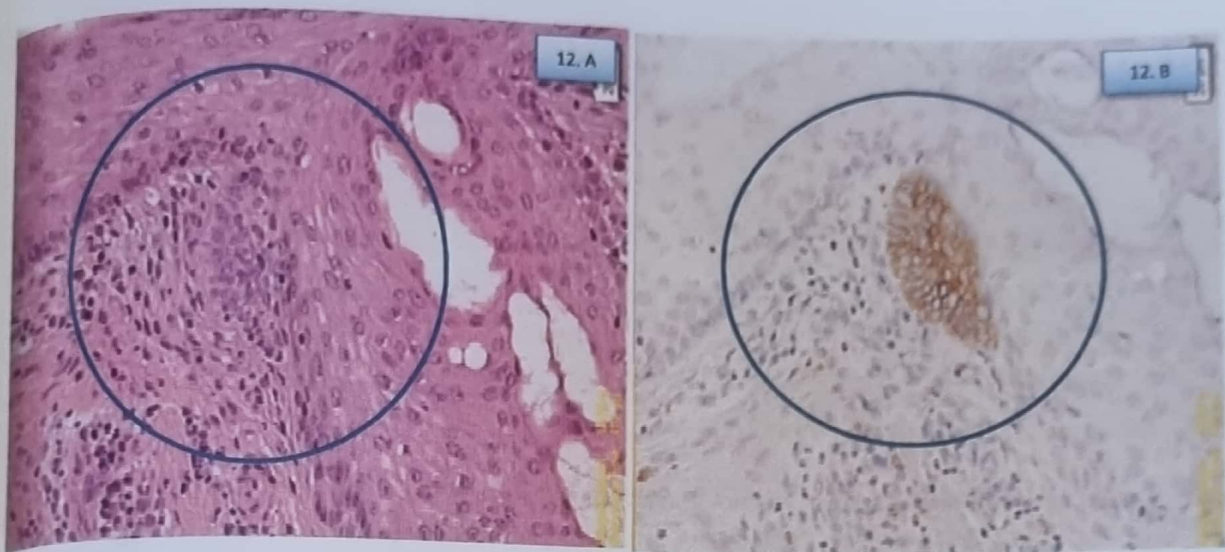
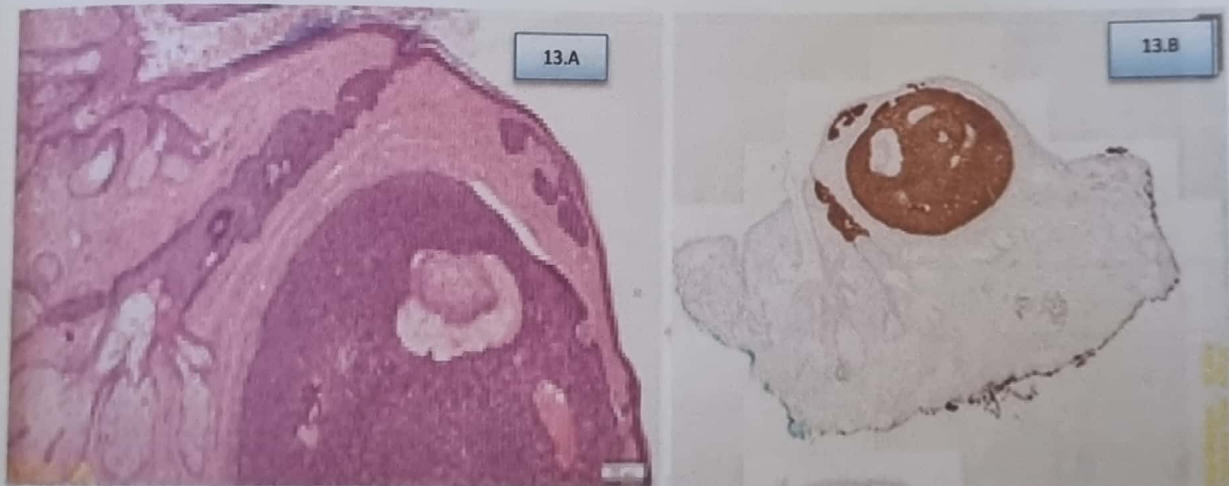


Foto 12: Pada pewarnaan HE tampak pertumbuhan tunas KSB di infundibulum folikel rambut (gambar 12.A). Lesi ini terlihat jelas pada IHK BerEp4 (gambar 12.B).



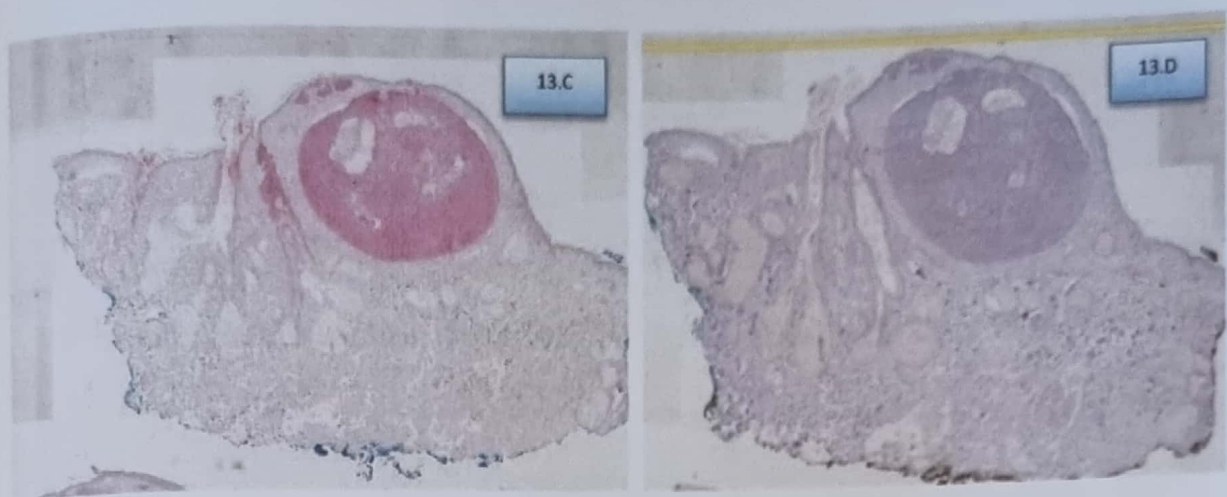
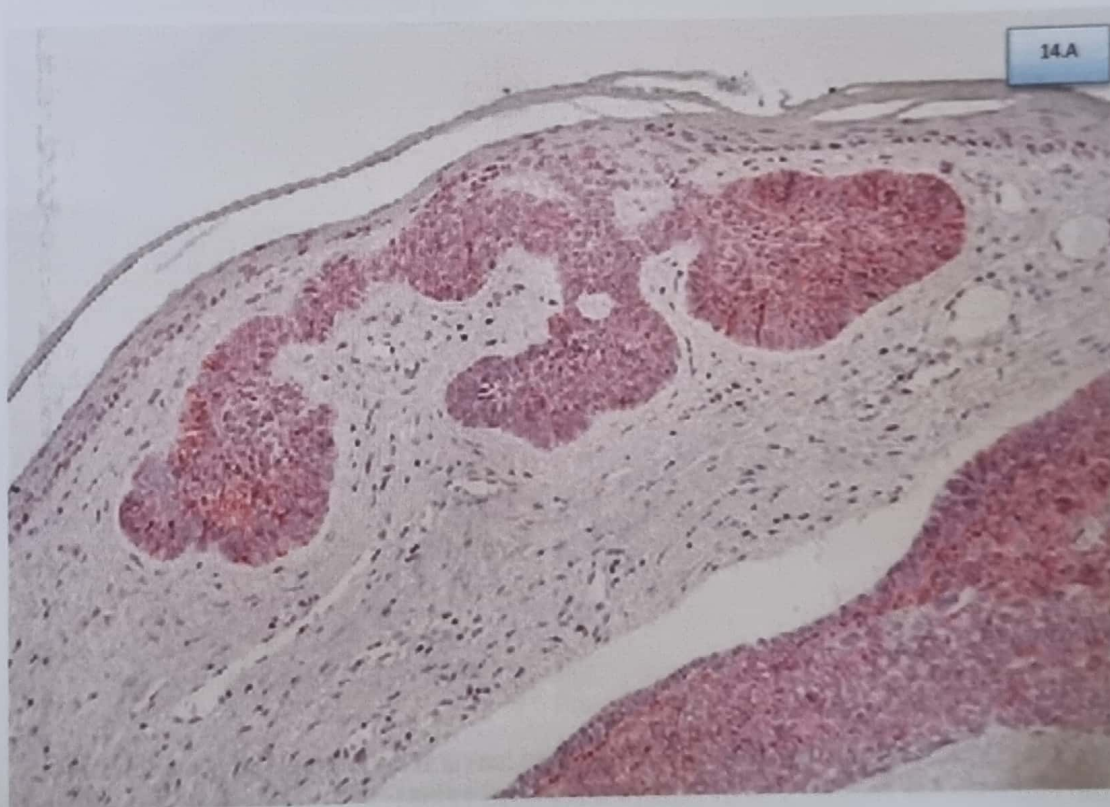


Foto 13: Tampak lesi KSB yang berada di daerah isthmus, *junctional*, dan lapisan basal epidermis. Dengan pewarnaan HE (13.A), IHC BerEP4 (13.B), IHC LRIG1 (13.C) dan IHC LGR6 (13.D)



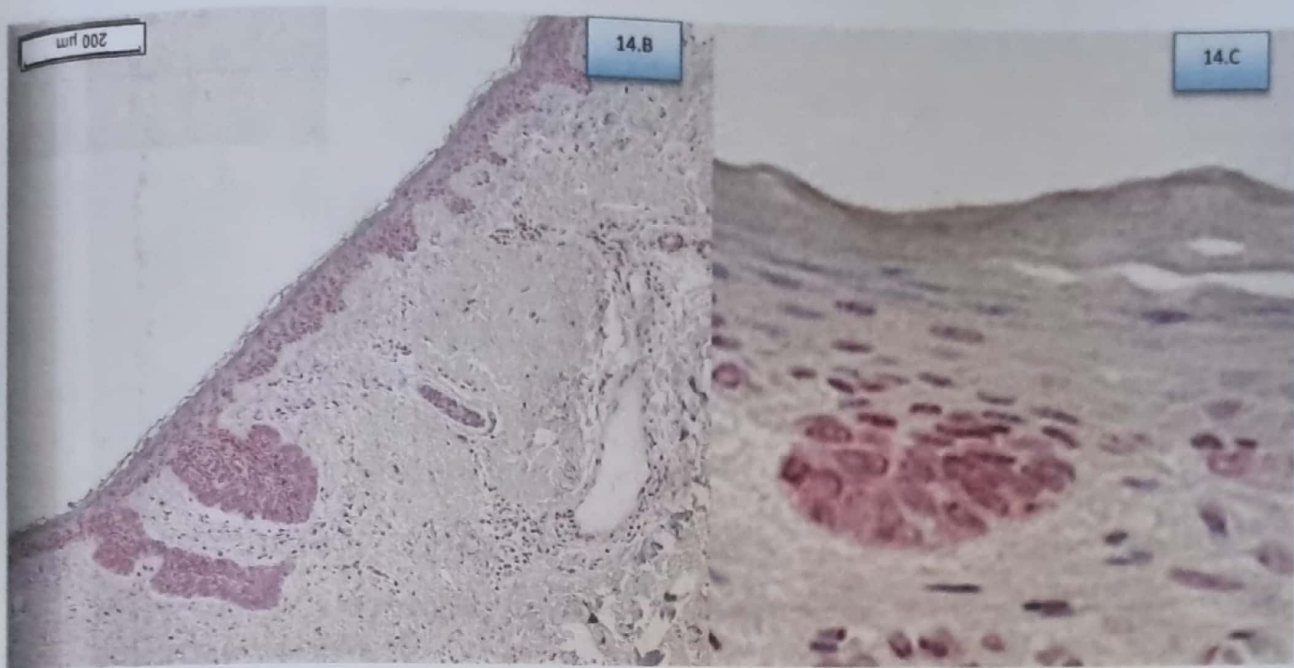


Foto 14. Lesi-lesi KSB dini yang berasal dari bagian sel basal epidermis positif dengan pewarnaan IHC LRIG1 (14.A,B,C). pada lesi yang lebih besar tampak positifitas lebih kuat di bagian tengah lesi dibanding bagian pinggir lesi (14.A). Lesi semakin besar semakin kuat juga positifitas terhadap IHC LRIG1 pada sitoplasma dan membran sel KSB

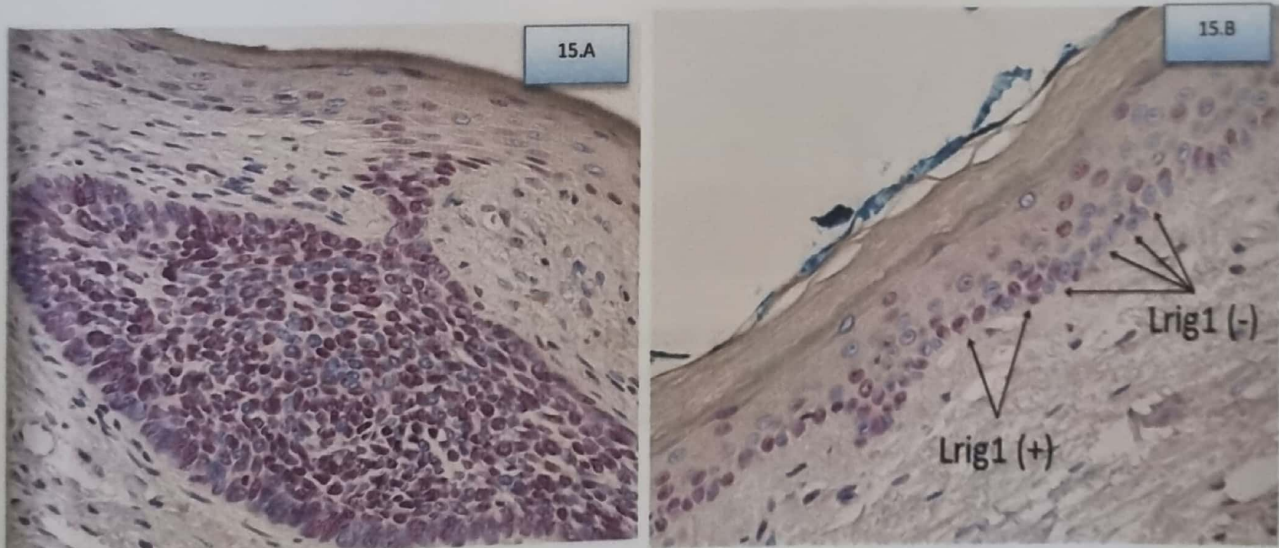


Foto 15: lesi KSB yang tumbuh dari daerah sel basal epidermis ke dalam dermis, menunjukkan hasil yang positif dengan pewarnaan IHC LRIG1 pada inti sel KSB (15.A), tampak sel-sel basal dan suprabasal epidermis juga positif dengan IHC LRIG1 secara acak (15.B).

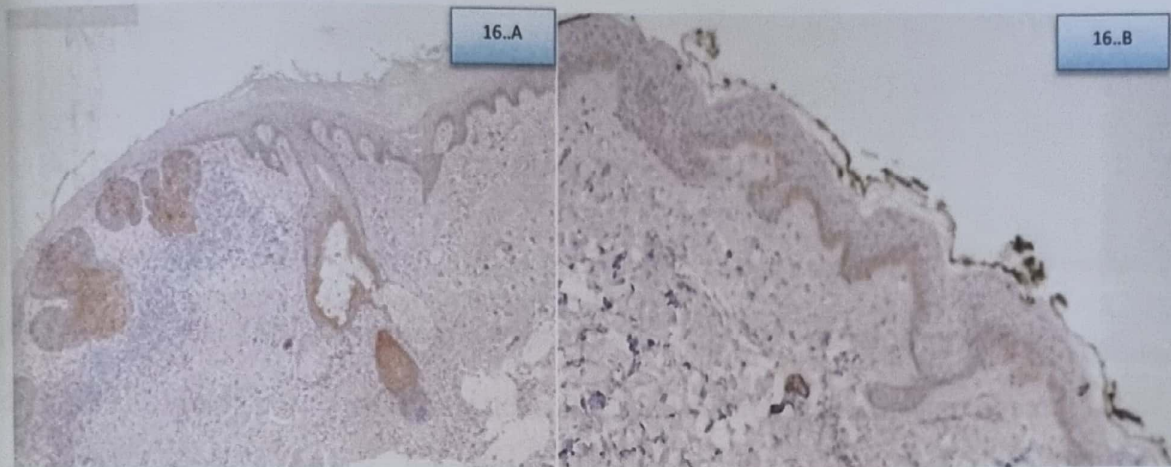


Foto 16: lesi KSB yang tumbuh dari daerah sel basal epidermis ke dalam dermis, menunjukkan hasil yang positif dengan pewarnaan IHK LGR6, tampak di bagian tengah lesi positifitasnya lebih tinggi dibanding dengan bagian pinggir lesi (16.A), tampak juga lapisan basal epidermispun positif dengan IHK LGR6 (16.B).

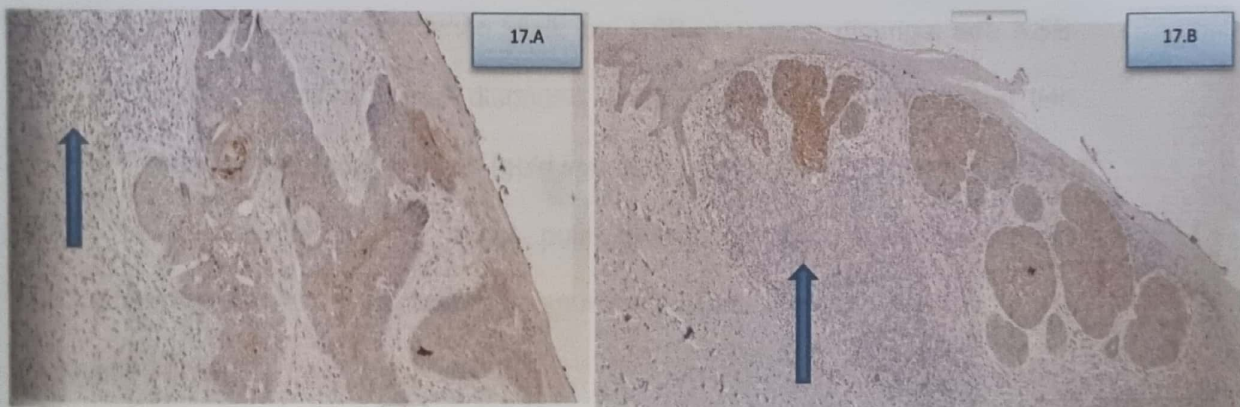


Foto 17: lesi KSB yang tumbuh dari daerah sel basal epidermis ke dalam dermis, menunjukkan hasil yang positif dengan pewarnaan IHK LGR6, tampak di bagian tengah lesi positifitasnya lebih tinggi dibanding dengan bagian pinggir lesi (17.A, 17.B), tampak juga serbukan sel-sel radang yang padat di sekitar lesi KSB (tanda panah).

BAB VI

PEMBAHASAN

A. DIAGNOSIS LESI DINI KSB DENGAN IHK BerEP4.

Pewarnaan IHK BerEP4 pada penelitian ini ternyata dapat mendeteksi dengan jelas lesi-lesi dini KSB yang secara pewarnaan HE sangat sulit atau tak mungkin didiagnosis, karena ciri-ciri kelainan histopatologis belum prominen. Bahkan dapat mendeteksi KSB dini dengan sel KSB yang masih sangat sedikit (2-15 sel), sehingga sangat meyakinkan akurasi untuk diagnosis dini KSB. Protein BerEP4 ternyata menjadi protein yang tepat yang dapat dijadikan target untuk mendeteksi lesi dini KSB, Temuan ini sangat berarti dalam pengembangan patologi molekuler dan penanganan klinik lesi KSB atau yang dicurigai ada KSB, karena berperan signifikan untuk diagnosis dini KSB sehingga pemeriksaan IHK BerEP4 dapat dijadikan baku emas (*gold standard*) diagnosis KSB, terutama KSB dini. Ke depan, BerEP4 ini dapat pula dikembangkan untuk kepentingan pengobatan yang sekarang populer dengan *molecularly targetted therapy* pada penyakit kanker.

Dari hasil pewarnaan IHK BerEP4 dibandingkan dengan pewarnaan HE yang selama ini rutin dipakai untuk diagnosis KSB, terlihat jelas bahwa pada lesi-lesi yang sangat kecil dimana pada pewarnaan HE masih belum jelas perbedaan sel-sel antara sel-sel KSB dengan sel-sel bukan KSB, tetapi pada pewarnaan dengan BerEP4 sudah terlihat positif kuat. Hasil ini sama dengan yang telah

dilaporkan peneliti lain (Limin Yu et al, 2009) sehingga pewarnaan IHK BerEp4 dapat dipakai sebagai "gold standard" diagnosis KSB. Selama ini, klinisi memberikan perhatian utama pada kehadiran lesi KSB pada batas sayatan pada waktu ektirpasi KSB, ternyata dari temuan pada penelitian ini menunjukkan bahwa lesi KSB sangat multipel. Oleh karena itu, jika klinisi menemukan adanya lesi KSB yang sudah kasak mata, berarti kemungkinan besar ada pula sejumlah lesi KSB dini yang belum jelas terlihat yang harus diperhitungkan dan yang lebih penting lagi untuk menentukan batas operasi suatu lesi apakah sudah bebas dari sel-sel KSB. Dengan kata lain seseorang yang sudah didiagnosis KSB dan sudah diangkat tumornya harus diperhitungkan sebagai kelompok yang memiliki resiko tinggi untuk munculnya lagi lesi KSB yang dapat terdeteksi secara klinis. Karena sebenarnya mereka sudah memiliki sejumlah KSB dini yang belum terdeteksi secara klinis. Hal ini penting karena menyangkut dengan rekurensi KSB post operasi, menentukan tindak lanjut dan evaluasi post operasi, khususnya tipe morfea (infiltratif) yang paling sering terjadi kekambuhan atau kelanjutan dari KSB (Widgerow and Christofides 2006).

Kegunaan marker BerEP4 diharapkan dapat pula menjadi solusi untuk kasus-kasus variant tipe KSB yang morfologi seperti sel skuamous, khususnya yang tanpa keratinisasi, sehingga sulit dibedakan dengan karsinoma sel skuamous akan tetapi diperlukan studi lebih jauh ekspresi biomarker ini pada kasus-kasus seperti tersebut di atas. Kajian yang terbatas hanya pada KSB dini belum dapat

memberikan kepastian, tetapi hasil penelitian ini setidaknya BerEP4 memiliki potensi untuk itu.

Didalam kelompok sel-sel KSB yang hampir selalu terlihat ada beberapa sel dengan ukuran yang lebih besar dari pada sel-sel monomorf poligonal yang lain, dengan sitoplasma lebih besar yang terlihat baik pada pewarnaan BerEP4 maupun pada pewarnaan HE (foto mikro : 5.A, 6.A, 7.A, 8.A), apakah ini menunjukkan aktifnya sebuah sel di dalam sarang sel-sel KSB, ataukah ada produksi dari sel yang tertimbun dalam sel seperti glikogen (Mikaelian and Wong 2003) . Sel-sel dengan ukuran lebih besar dan yang sedang aktif berproliferasi ini mungkin merupakan *stem cell* epidermis yang sudah mengalami transformasi maligna pada saat sudah menjadi *epidermal stem cells* atau pada *stem cells* yang lebih primitif akan dibahas pada pembahasan mengenai *stem cell* asal KSB.

B. LOKASI ASAL KSB

Lokasi asal (*site of origin*) KSB sampai saat ini masih belum jelas, dianggap berasal dari sel basal interfolikular (Krompecher E 1903, Geschicker 1935,, (Zackheim 1962), basal cell (Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999; Sellheyer 2011), bagian germinativum folikel rambut, (Lever 1948; Ackerman, P.A et al. 1993; Sellheyer 2011). (Foot NC (1974). *Outer root sheat (ORS) of hair follicle*(Asada, Schaart et al. 1992; Krüger, Blume-Peytavi et al. 1999; Sellheyer 2011), Penelitian-penelitian tentang lokasi asal dari KSB sebelumnya, pada umumnya dilakukan pada kulit tikus dan KSB stadium lanjut pada manusia. Kelemahan penelitian

diatas dapat dijelaskan bahwa kulit tikus hanya mempunyai 2 lapisan epidermis, lebih datar, berbeda dengan kulit manusia yang mempunyai beberapa lapisan. Sedangkan pada KSB stadium lanjut, pengamatan tentang lokasi awal dimana muncul KSB sudah sulit. Pada penelitian ini, lesi-lesi KSB adalah lesi dini dari penderita (manusia) bukan binatang percobaan.

Pincus menyarankan dan menyatakan bahwa : *All evidence for tumor origin based on connections of a size able growing tumor with one or other normal structure of the skin rests on very shaky ground. A tumor usually grows centrifugally from its site of origin. We cannot expect to find information about the site by examing the periphery. We must go to the smallest and earliest tumors available. That means that almost any tumor that is visible to the naked eye is already too large and too far advanced.* (Hermann Pinkus, 1965). Berdasar pada pendapat Herman Pinkus tersebut maka penelitian ini meneliti KSB yang masih sangat dini, ada yang masih terdiri atas beberapa sel KSB (2-15 sel), yang hanya dapat didiagnosis dengan bantuan pewarnaan IHK BerEP4, sehingga lokasi asal KSB dapat dengan jelas diidentifikasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 96,4% dari 394 lesi KSB dini terdapat di daerah basal epidermis (interfolikuler), hanya 3,5% terdapat di daerah folikel rambut. (foto mikro : 4 dan 11, Tabel: 1). Jumlah kasus KSB dengan lokasi lesi pada folikel (26,09%) sebenarnya mempunyai lesi KSB gabungan yaitu di interfolikuler dan folikel, Jumlah kasus yang memiliki lesi KSB hanya pada interfolikuler saja jauh lebih banyak (73.9%). Bahkan seluruh kasus menunjukkan

adanya lesi KSB dini pada interfolikuler. Teori lama lokasi asal KSB berawal pada folikel rambut, penemuan pada penelitian ini adalah sebaliknya yaitu berawal pada interfolikuler. Berarti sesuai hipotesis pertama bahwa lokasi asal origin dari KSB berawal pada lapisan sel basal epidermis.(interfolikuler)

Hasil penelitian dengan BerEP4 dan HE, jelas terlihat bahwa pertumbuhan KSB kebanyakan berasal dari lapisan basal epidermis (interfoliikuler) dan sedikit pada infundibulum (folikuler). Marker ini diekspresikan terus mulai dari lesi yang sangat kecil (2-15 sel) hingga tumbuh sampai menjadi lesi yang besar (>30 sel). Dari pengamatan histologis, terlihat bahwa lesi KSB yang sudah besar tidak terlepas dari lapisan basal epidermis. Nampaknya sel-sel KSB memiliki sifat seperti sifat sel-sel holoklon yang memiliki reseptor $\beta 1$ integrin yang membuatnya senantiasa adesi/menempel kearah kolagen tipe IV di *Basal Membrane Zone* (Holbrook and Wolff 1993; Jones and Watt 1993; Pincelli and Marconi 2010), Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkapkan kehadiran molekul adesi ini pada sel sel KSB.

Hasil observasi histologis selanjutnya adalah pada lesi KSB yang sedikit lebih besar dengan jumlah 15-30 sel, KSB menunjukkan pertumbuhan dengan gambaran "*downward blooming flower*" seperti pertumbuhan bunga kol dari lapisan epidermis ke dalam dermis, yang selanjutnya pada lesi-lesi yang sudah lebih besar lagi akan tumbuh membentuk nodul. Pertumbuhan demikian ini mungkin disebabkan oleh adanya reseptor $\beta 1$ integrin pada sel-sel KSB dimana diketahui bahwa $\beta 1$ integrin berperan dalam interaksi sel membentuk koloni (*colony forming*

efficiency). Pada lesi KSB yang menjulur ke dermis terlihat sel-sel monomorf yang terkumpul di tengah lesi dikelilingi oleh sel-sel basal yang tersusun palisade (merupakan ciri khas dari KSB). Tetapi oleh karena sel-sel palisade ini tidak positif dengan IHK BerEP4 maka timbul dugaan bahwa barangkali sel-sel palisade ini bukan sel KSB (foto mikro: 5.B, 6.B, 6.D). Tidak terwarnanya sel-sel palisade KSB dini dengan IHK BerEP4 menimbulkan pertanyaan baru tentang sel-sel palisade ini yang selama ini merupakan salah satu karakter gambaran histopatologis dari KSB, Apakah sel-sel palisade ini sebenarnya bukan KSB tetapi sel basal normal epidermis yang terdorong oleh pertumbuhan KSB sehingga nampak mengitari KSB. Paling tidak, pada KSB dini nampak bahwa sel-sel palisade bukan bagian dari KSB berdasar pewarnaan IHK BerEP4, apakah sel-sel palisade yang terlihat pada KSB lanjut demikian juga, masih memerlukan penelitian pada KSB lanjut. Kesan bahwa lesi KSB mendorong lapisan sel-sel basal normal ke dalam dermis diperkuat pula oleh gambaran bahwa jaringan dermis terdesak oleh lesi KSB sehingga disekitar lesi KSB terlihat lebih padat sebagai akibat adanya tekanan pertumbuhan tumor ke daerah dermis, Seperti diketahui bahwa dermis menghasilkan mitogen (*growth factors*) maupun faktor lain dari mesenkim (*nestin*) yang mempengaruhi pertumbuhan KSB. Dengan demikian lesi KSB yang terdesak ke dermis justru mendapatkan fasilitas untuk bertumbuh.

Sel-sel KSB tidak tumbuh ke arah epidermis bagian atas seperti apa yang terlihat pada penelitian ini, mungkin disebabkan oleh sulitnya sel-sel KSB mendesak sel-sel holoklon yang lebih padat membentuk epidermis sehingga lebih

sulit bertumbuh ke arah dermis. Berbeda dengan pertumbuhan karsinoma sel skuamos yang tumbuh ke atas karena memang merupakan bagian dari epidermis atau pertumbuhan sel kanker terjadi dalam epidermis.

Jumlah lesi KSB dini pada penelitian ini sangat multipel, dari 32 kasus biopsi kulit terdapat 394 lesi KSB dini. Kenyataan klinik menunjukkan ketidaksesuaian karena pada umumnya lesi KSB lanjut tidak multipel. Hal ini mungkin disebabkan bahwa diagnosis KSB secara histopatologi dan klinis hanya menemukan KSB yang sudah lanjut, lesi-lesi kecil KSB dini lolos dari perhatian. Kemungkinan lain, lesi-lesi KSB dini yang kecil-kecil sebagian besar tidak bertumbuh menjadi KSB lanjut karena dieliminasi oleh respon imun. Eliminasi oleh respon imun ini dimungkinkan oleh sifat KSB yang memiliki kemampuan proliferasi yang rendah sehingga gampang dieliminasi oleh respon imun.

C. STEM CELL ASAL KSB

Analisis *stem cells* asal KSB yang dikemukakan disini didasari atas hasil penelitian Snippert 2010 yang berusaha mencari "*the mother of the epidermal stem cell*" yang menemukan: bahwa sel-sel yang mengekspresi LGR6 terus menerus diproduksi tetapi Snippert belum mengetahui kemana perginya stem cell itu. Balanpain, 2010 yang kemudian menjelaskan bahwa *isthmus stem cell* yang ada di sentral *isthmus* akan bermigrasi ke daerah perifer menjadi *junctional stem cells* dan mengekspresikan marker baru yaitu LRIG1, walaupun tetap mengekspres LGR6. Selanjutnya *junctional stem cells* akan naik ke arah

epidermis menjadi *epidermal stem cell* dan tetap mengekspresikan marker LRIG1 dan LGR6.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa KSB dini mengekspresikan marker *isthmus stem cell* yaitu LGR6 dan marker *junctional stem cells* yaitu LRIG1, bahkan menunjukkan ekspresi yang lebih tinggi dibanding dengan sel-sel basal epidermal normal yang juga mengekspresikan kedua marker ini. Dengan demikian, dapat dikemukakan bahwa KSB dapat berasal dari *isthmus stem cell* atau *junctional stem cells* yang mengalami mutasi atau transformasi maligna.

Penelitian ini menemukan lokasi asal lesi KSB dini pada seluruh kasus berada pada lapisan basal epidermis dimana hanya ada 6 kasus yang selain berada pada lapisan basal epidermis ditemukan juga pada folikel. Peneliti berpandangan bahwa memang lokasi asal KSB dini muncul kebanyakan di interfolikuler dibanding di folikel tetapi tidak berarti bahwa proses karsinogenesis baru mulai pada saat sudah menjadi *epidermal stem cell*, mutasi yang menyebabkan terjadinya transformasi maligna dapat terjadi pada saat masih sebagai *isthmus stem cell* atau *junctional stem cell* yang bergerak ke lokasi interfolikuler setelah mengalami mutasi. Dengan kata lain, bahwa memang KSB bisa muncul dari *epidermis stem cells* karena kenyataannya lokasi asal KSB kebanyakan pada daerah interfolikuler tetapi KSB ini bisa berasal dari *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells* yang mengalami mutasi dan bergerak ke arah interfolikel untuk menjadi *epidermal stem cells* dan selanjutnya menjadi lokasi asal KSB (foto mikro: 13.A-13.D). Pandangan dari temuan marker *stem cells* pada

penelitian tentang *stem cell* yang menjadi asal KSB ini sesuai dengan yang dikemukakan Selheyer dan Kahn yaitu *stem cells* yang mempunyai sifat *long resided* di folikel rambut dan mengalami stimulasi yang cukup kuat untuk menjadi KSB di kemudian hari. (Selheyer and Krahl 2010). Demikian juga halnya dengan apa yang dikemukakan oleh Shipitsin and Polyak bahwa *stem cell* yang mengalami mutasi misalnya oleh sinar UVB akan bersifat *carcinogen retaining cell* yaitu sel yang sudah mengalami transformasi akan menetap untuk kemudian menjadi sumber KSB. (Shipitsin and Polyak 2008),

Pada pewarnaan BerEP4 terlihat fokus-fokus KSB dengan ekspresi kuat bertebaran sepanjang lapisan basal epidermis, gambaran ini mirip dengan pewarnaan dengan P63 oleh Pellegrini untuk memberi gambaran *stem cell* epidermis. Gambaran ini dapat mendukung bahwa sel origin KSB tersebut adalah *epidermal stem cell*, (Gambar 21,22 dan foto mikro 4,11). Seperti diketahui bahwa *isthmus stem cell* dapat meningkat menjadi *junctional stem cells* dan selanjutnya *junctional stem cells* menjadi *epidermal stem cells*. Penelitian ini menemukan lokasi asal KSB dini memang kebanyakan pada lokasi yang sesuai dengan lokasi *epidermal stem cells* tetapi proses karsinogenesis berupa transformasi maligna telah terjadi pada *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells* karena KSB dini masih mengekspresikan protein marker *stem cell* originnya yaitu LGR6 untuk *isthmus stem cell* dan LRIG1 untuk *junctional stem cells*. Hal ini diperkuat dengan adanya KSB dini yang tetap tumbuh di folikel yang berarti berasal dari *stem cell* yang ada di folikel yaitu *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells* yang tidak

menjadi epidermal stem cells, Dengan kata lain, mutasi atau transformasi maligna dapat terjadi pada *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells*. Ini sesuai dengan pendapat Walce Halper (1950) yang mengatakan bahwa KSB berasal dari *embryonic primary epithelial cells* atau dari folikel (Kruger, Blume-Peytavi 1999) dan pendapat dari Pincus yang menganggap KSB berasal dari *stem cell* pluripoten dalam hal ini adalah *isthmus stem cell* yang bersifat pluripoten (Pinkus and Kurtin 1985). KSB berasal dari stem cell pluripoten didukung oleh hasil penelitian ini dimana KSB mengekspresikan protein LGR6 sebagai marker *stem cell* primitif (multipoten). Walaupun marker dari *bulge stem cells* tak diperiksa pada penelitian ini, temuan pada penelitian ini nampaknya mendukung pula temuan peneliti lain yang menyatakan bahwa KSB bukan berasal dari *bulge stem cells* (Youssef, Keymeulen et al. 2010).

Pada kulit, LRIG1 merupakan suatu marker untuk sel interfolikuler dan *Junctional stem cell* dan *epidermal stem cells* (Snippert, Haegebarth et al. 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terhadap marker LRIG1 positif pada sitoplasma dan inti sel KSB dengan perincian positif ringan 27,74, positif sedang 52,17% dan positif kuat 26,09% marker LRIG1 positif juga pada *epidermis stem cell* yang pada penelitian ini kelihatan positif pada sel-sel basal epidermis normal. Yang menjadi pertanyaan adalah KSB dini yang ternyata mengekspresikan marker LRIG1 apakah berasal dari *junctional stem cells* atau *epidermal stem cells*. Ada dua kemungkinan yaitu, pertama KSB berasal langsung dari *Junctional stem cell*, yang mengalami transformasi maligna dan tetap mengekspresikan marker

Junctional stem cell sesudah menjadi KSB. Kedua, KSB berasal dari *epidermal stem cell* yang merupakan kelanjutan diferensiasi dari *junctional stem cell* dan tetap mengekspresikan marker *junctional stem cell*, walaupun sudah menjadi KSB. Dengan kata lain, transformasi maligna terjadi pada *junctional stem cell* bukan pada *epidermal stem cells*. Seandainya mutasi terjadi pada *epidermal stem cells* yang sudah ada di epidermis maka KSB dini yang akan timbul kemungkinan besar hanya satu lesi saja. Lain halnya jika mutasi terjadi pada *stem cell* yang lebih primitif (*isthmus stem cell* dan *junctional stem cells*) yang masih berada di folikel maka sel-sel yang sudah mengalami transformasi maligna akan bergerak ke epidermis mengikuti pergerakan fisiologis untuk homeostatis kulit untuk menjadi *epidermal stem cells* yang akan bertebaran ke berbagai lokasi di epidermis dengan kata lain akan menghasilkan KSB dini yang multipel atau *multicentric* yang biasa disebut *superficial multicentric basal cell carcinoma* (SMBCC). Penemuan Lang Pearson pada tahun 1987 yang membuktikan dengan rekonstruksi tiga dimensi menggunakan komputer dari SMBCC menyimpulkan bahwa origin dari SMBCC ini sebenarnya adalah *unicentric*. Hasil penelitian ini lebih menjelaskan tentang *unicentric* yaitu KSB dini yang bertebaran *multicentric* di epidermis (interfolikel) itu berasal dari *isthmus stem cells* atau *junctional stem cells* pada folikel. Peran *junctional stem cells* yang aktif untuk homeostatis kulit pada keadaan normal, untuk mempertahankan dan memelihara *epidermal stem cell* telah dilaporkan oleh peneliti terdahulu (Ohyama 2009). Pada penelitian ini, pada semua kasus ditemukan multipel KSB dini yaitu sebanyak 394 lesi pada 32 kasus, sehingga temuan pada penelitian ini, baik dilihat dari lokasi asal KSB dini maupun dari hasil

pemeriksaan marker *stem cells*. sangat mendukung bahwa KSB berasal dari *isthmus stem cells* dan *junctional stem cells* yang mengalami mutasi. Analisis diatas mendukung pernyataan Pincus dan Yossef, bahwa KSB berasal dari sel pluripoten dan merupakan bagian dari sel *long term residents progenitor* dari interfolikuler epidermis bagian atas dekat infundibulum dan bukan dari *Bulge stem cells*.

Demikian juga beradaan lesi KSB pada folikel rambut dapat dijelaskan bahwa KSB berasal dari *isthmus stem cell* atau *junctional stem cells* yang mengalami mutasi tapi tidak bergerak ke epidermis (interfolikuler) dan berkembang menjadi KSB di folikel karena memang secara fisiologis *stem cell isthmus* dapat berdiferensiasi menjadi folikel rambut yang berarti *stem cells isthmus* atau *junctional stem cells* tidak selalu harus bergerak ke interfolikuler. Bahkan keberadaan KSB pada folikel mendukung pandangan yang telah dikemukakan di atas bahwa KSB berasal dari mutasi pada *isthmus stem cell* atau *junctional stem cells*

KSB yang berlokasi di interfolikuler dan folikel dapat berasal dari *isthmus stem cell* atau *junctional stem cells* yang mengalami transformasi maligna. Hal ini tidak bertentangan dengan apa yang diduga oleh Markey yang melakukan penelitian dengan membandingkan sitokeratin 17 yang terdapat pada KSB dan *outer root sheath* (ORS) folikel rambut. Dia menduga bahwa KSB berasal dari ORS folikel rambut dimana berada *isthmus stem cell* dan *junctional stem cells* dan tidak berasal dari *bulge stem cell* (Markey, Lane et al. 1992; Heenan and Bogle 1993).

Stem cells asal KSB yang ditemukan pada penelitian ini memperkuat hasil penelitian terdahulu yang menyimpulkan adanya hubungan antara siklus rambut dengan *follicular stem cell* dan karsinogenesis (Miller, Tung-Tien Sun et al. 1993)

D. KENAPA KSB LOW GRADE DAN JARANG METASTASIS.

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan terhadap LRIG1 (*Human leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1*) yaitu suatu protein transmembran pada permukaan sel, yang telah dilaporkan sebagai regulator negatif terhadap *epidermal growth factor receptor* (EGFR) yang merupakan signal proliferasi sel melalui tirosin kinase sehingga dilaporkan banyak terlibat dalam karsinogenesis berbagai jenis tumor. Regulator negatif LRIG1 (dulu disebut LIG-1) terhadap EGFR dilakukan dengan cara meningkatkan ubiquitilasi dan degradasi reseptor yang menerima stimulasi dari EGF ini dengan cara meningkatkan rekrutmen c-Cbl dan E3 ubiquitin. LRIG1 berperan sebagai penghambat aliran signal melalui jalur tirosin kinase sehingga inaktivasi LRIG1 dapat memicu hiperplasia sel termasuk pada kulit (Gal Gur et al, 2004). LRIG1 telah dilaporkan juga menghambat aktivasi Myc yang terlibat dalam sintese DNA sehingga hilangnya gen LRIG1 akan meningkatkan kapasitas proliferasi *stem cell in vitro* dan hiperplasi epidermal *in vivo* (Kim B, Jensen et al, 2009). Oleh karena LRIG1 berperan sebagai regulator negatif terhadap ekspresi EGFR dan Myc, sehingga disimpulkan bahwa LRIG1 yang diekspresikan oleh berbagai *stem cells* berperan dalam menjaga agar *stem cells* tetap tenang atau tidak membelah sehingga tidak terjadi proliferasi *stem cell* (Kim B, Jensen dan Fiona M, Watt, 2006).

LRIG1 diekspresikan pada sel basal epidermis, penurunan LRIG1 akan menyebabkan peninggian EGFR pada permukaan sel dan memicu terjadinya proliferasi.

Gen LRIG1 yang berada pada kromosom 3p14.3, regio yang diketahui banyak terlibat dalam kejadian kanker pada manusia, ditemukan mengalami penurunan ekspresi dalam berbagai *tumor cell lines* dibanding dengan ekspresi pada sel normal sehingga ditengarai ada perannya sebagai *tumor suppressor gene* (Hakan Hedman et al, 2002). Hedman dan Henrikson (2007) melaporkan bahwa pada LRIG1- *knockout mice* ditemukan berkembangnya lesi psoriatik sebagai konsekuensi dari hiperproliferasi sel keratinosit epidermis dan melaporkan pula bahwa ekspresi LRIG1 menurun pada berbagai kanker stadium lanjut tumor kulit dan serviks. Tetapi telah dilaporkan pula bahwa ekspresi LRIG1 tidak berubah pada berbagai tumor seperti kanker prostat dan leukemia. (Noriko Gotoh, 2009).

Pada penelitian ini yang menggunakan tehnik pewarnaan IHK, terlihat adanya ekspresi yang lebih tinggi dari LRIG1 pada sel-sel KSB dibanding dengan sel-sel basal epidermis normal pada kulit yang sama. Perbedaan ekspresi dengan melihat perbedaan derajat positifitas pewarnaan IHK telah dikontrol dengan menggunakan dua orang *observer* dengan hasil yang sama (Uji test Kappa dapat diterima). Hasil observasi dari kedua *observer* menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna antara tingginya ekspresi LRIG1 pada sel-sel KSB dibanding dengan sel-sel basal epidermis normal dari kulit yang sama. ($p = 0.00$)

Oleh karena jelasnya peran LRIG1 dalam menghambat proliferasi sel dan tingginya ekspresi marker ini pada sel-sel KSB dibanding dengan sel-sel basal normal, maka temuan ini dapat menjawab pertanyaan tentang mekanisme karsinogenesis bagaimana yang membuat KSB tergolong *low grade cancer* dengan kemampuan metastasis yang rendah. Dengan kata lain LRIG1 berperan sebagai *tumor supressor* pada KSB yang membuatnya memiliki kemampuan proliferasi yang rendah.

Temuan tentang pentingnya peran LRIG1 pada karsinogenesis KSB mengundang perhatian untuk menjadikan marker ini sebagai marker yang dapat diaplikasikan dalam penanganan KSB. LRIG1 dapat digunakan sebagai biomarker untuk menilai prognosis KSB dini, jika ekspresi tinggi petanda prognosis baik atau sebaliknya. Pada penelitian ini terdapat 6,6% lesi yang tidak menunjukkan ekspresi marker ini berarti memiliki resiko tinggi untuk berkembang menjadi KSB lanjut yang lebih ganas dan mampu metastasis. LRIG1 dapat pula sebagai biomarker untuk memantau keberhasilan pengobatan *targetted therapy* yang menggunakan antiEGFR, dengan melihat meningkatnya ekspresi biomarker LRIG 1 pada sel-sel KSB setelah diterapi dengan anti EGFR karena adanya kemungkinan bahwa ekspresi LRIG1 sebagai *inhibitor* proliferasi akan meningkat sebagai akibat dari terputusnya signal proliferasi lewat EGFR (sebagai *feedback inhibitor*)

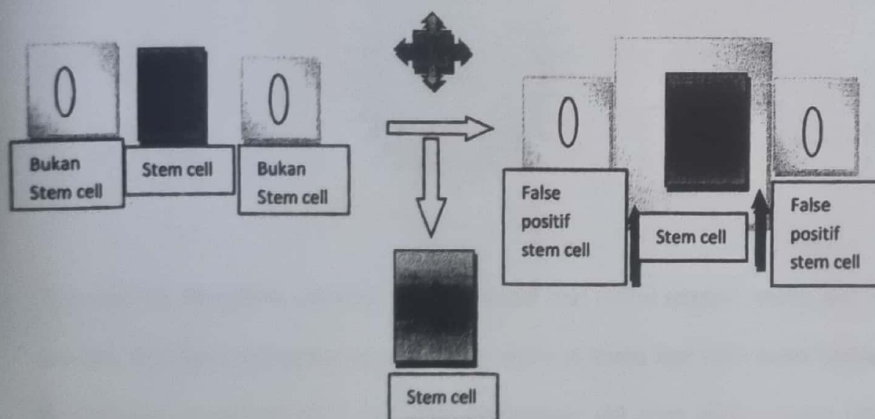
Pada penelitian ini, dilakukan juga observasi tentang ekspresi marker LGR6, hasilnya sama dengan marker LRIG1 yaitu memperlihatkan ekspresi yang lebih tinggi pada sel-sel KSB dibanding dengan sel-sel basal epidermis normal dari kulit

yang sama ($p < 0.0105$). Peran dari LGR6 dalam proliferasi sel atau kemungkinan dalam karsinogenesis masih perlu diungkap lebih jauh melalui penelitian tentang peran utama marker *stem cell* ini dalam karsinogenesis



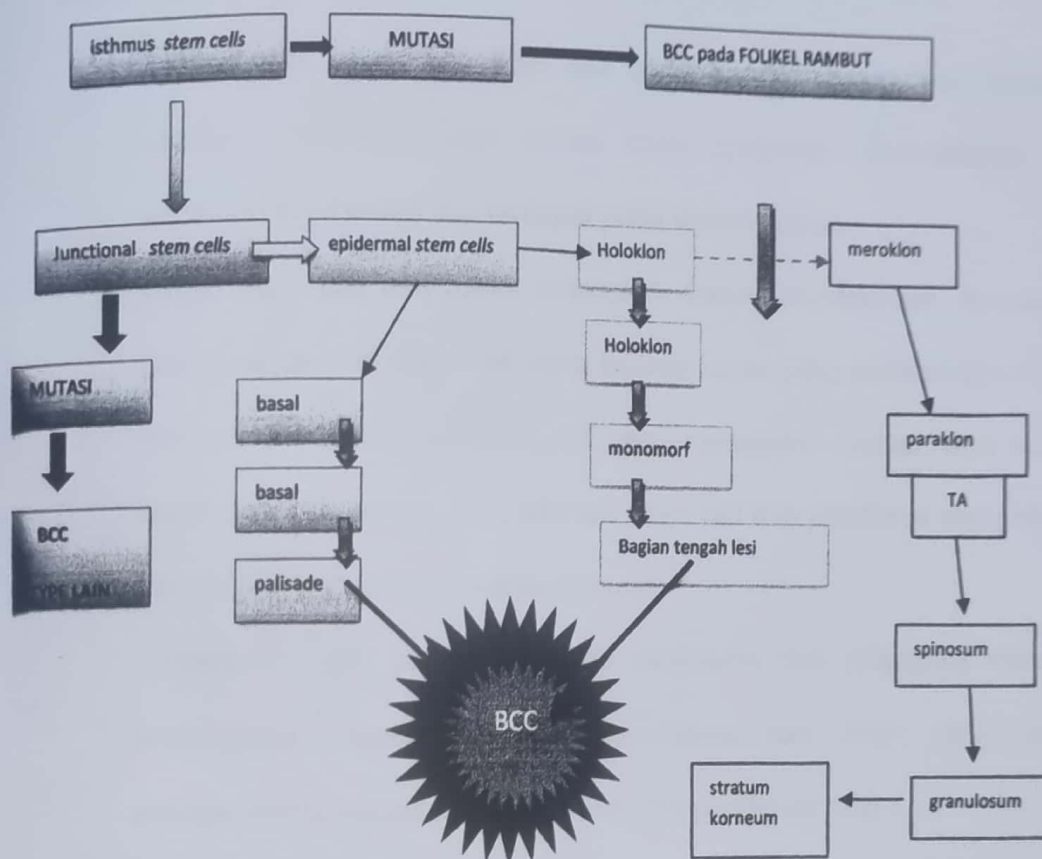
E. Kelemahan dalam penelitian ini

1. Antibodi LGR6 dan LRIG1 merupakan antibodi baru ditemukan dan baru dilakukan pewarnaan untuk sample KSB
2. Hasil penilaian akan lebih baik bila dilakukan *double staining* untuk antibodi LGR6 dan LRIG1
3. Pewarnaan untuk LGR6 dan LRIG1 dengan warna yang berbeda sehingga sulit dibandingkan intensitas warna untuk kedua antibodi tersebut
4. sulit untuk mengetahui lokasi *stem cell* yang tepat dan terwarnai inti selnya dengan jelas, karena perlu adanya suatu marker protein khusus untuk *stem cell* spesifik di inti dan sitoplasma saja, dan tidak mewarnai sel membran, bila mewarnai membran sel maka *stem cell* tidak terlihat jelas karena akan samar karena *overlapping* (ilustrasi dibawah)



Gambar 33. Ilustrasi sifat antibodi yang mewarnai membran sel, akan terjadi overlapping dua sel yang berdampingan, sehingga sulit menemukan sel spesifik diantara sel-sel yang lain dibanding dengan yang hanya mewarnai inti sel atau sitoplasma sel (warna orange)

Gambar 34 : Ilustrasi hubungan antara lokasi asal origin stem cell KSB dengan berbagai sub tipe KSB



Gambar 35. Bila *stem cell* origin KSB berasal dari folikel rambut, maka lesi KSB terletak di folikel rambut, bila *stem cell* origin berasal dari *junctional* maka tipe KSB akan berbeda dengan *stem cell* berasal dari *epidermal stem cell* yang merupakan ciri khas KSB dengan sel-sel monomorf pada sentral lesi dan ciri khas palisadenya

BAB VII

KESIMPULAN, KOMENTAR DAN SARAN

VII.A. KESIMPULAN

1. Lokasi asal origin lesi KSB dini pada hampir semua lesi diidentifikasi sebagai multifokus pada sel-sel basal epidermis (interfolikuler), hanya sejumlah kecil kasus lesi terdapat pada daerah folikel.
2. Origin stem cell dari tumor muncul di daerah interfolikuler kemungkinan adalah epidermal stem cell pada lapisan basal yang berasal dari stem cell isthmus dan junctional stem cell yang mengalami mutasi. Jadi stem cell origin dari ksb berasal dari isthmus stem cell dan junctional stem cell yang mengalami transformasi karsinogenesis
3. Karakteristi KSB yang low grade carcinoma dan jarang nya metastasis kemungkinan disebabkan oleh overekspresi dari LRIG1 yang berperan sebagai tumor supressor yang mencegah proliferasi KSB
4. Pewarnaan IHC BerEP4 dapat digunakan untuk mendeteksi lesi KSB yang sangat dini.

VII.B. KOMENTAR

1. BerEP4 dapat digunakan sebagai "gold standar "
2. Sel-sel palisading yang mengitari lesi KSB kemungkinan besar bukan sel-sel KSB
3. KSB tumbuh berasal dari *stem cell* isthmus primitif dan *stem cell junctional* yang mengalami mutasi
4. KSB dini kebanyakan tumbuh dari lapisan basal epidermis, berarti *stem cell* yang sudah mutasi terus bergerak menuju ke epidermis (pergerakan fisiologis), dan mulai bertumbuh menjadi KSB kebanyakan pada lapisan basal epidermis
5. KSB jarang metastasis (low grade karsinoma) mungkin disebabkan oleh sifat tumor supressor dan stabilitas *stem cell* (anti proliferasi) dari LRIG1 yang terekspresikan dengan kuat pada sel-sel KSB
6. Subtipe KSB baik secara klinis maupun histopatologis dipengaruhi oleh lokasi asal origin dari *stem cell*
7. Sel-sel berbentuk monomorf di bagian sentral lesi KSB diduga adalah sel-sel holoklon dengan sifat kandungan reseptor $\beta 1$ integrin yang tetap terikat pada BMZ lapisan basal epidermis, sehingga walaupun sudah tumbuh membesar ke dalam dermis, tidak terpisah dari lapisan epidermis.
8. Pertumbuhan KSB ke arah dermis menandakan adanya hubungan yang erat antara mesenkim dermis dengan pertumbuhan KSB

9. Lesi KSB yang multipel ditemukan secara histopatologis sangat berbeda dengan gambaran klinis yang lebih sering dijumpai nodul tunggal, diduga berhubungan dengan efek eliminasi secara imunologis, seperti yang ditemukan dalam penelitian ini, dengan reaksi sel-sel radang yang padat di sekitar lesi.

VII.C. SARAN

1. Untuk mengetahui apakah KSB bisa juga berasal dari holoklon atau *epidermal stem cell* perlu dilakukan marker cell dengan $\beta 1$ integrin, survivin dan P63 pada lesi KSB
2. Penggunaan IHC BerEP4 untuk diagnosis dini KSB yang belum terlihat secara klinis oleh klinisi, sehingga margin eksisi bisa jelas bebas dari tumor atau tidak
3. Penelitian lebih jauh tentang mekanisme LRIG1 menghambat proliferasi dan metastasis KSB



KEMENTERIAN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10, Makassar Telp (0411) 5780103, Fax (0411) 581431
Contact person dr. Agussalim Bukhari, PhD, SpGK (HP. 081241850838), email agussalimbukhari@yahoo.com

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK
Nomor : 0926 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2011

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, setelah melalui pembahasan dan penilaian, pada rapat tertanggal 7 September 2011, telah memutuskan, protokol penelitian berjudul:

Studi Sel Asal Karsinoma Sel Basal dengan Pemeriksaan Imunohistokimia terhadap Marker Sel Stem Epidermis

dengan Peneliti Utama: **dr. Sukmawati Tansil Tan., SpKK**

No. Register

U	H	1	1	0	8	0	2	2	3
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

yang diterima pada tanggal: **23 Agustus 2011**

Perbaikan diterima tanggal: **16 September 2011** ,

dapat disetujui untuk dilaksanakan di **Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.**

Persetujuan Etik ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian.

Pada akhir penelitian, **laporan pelaksanaan penelitian** harus diserahkan kepada **KEPK Fakultas Kedokteran Unhas**. Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 20 September 2011

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas

Ketua

Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK
NIP 19600504 1986 01 2 002



Sekretaris

dr. Agussalim B, NMed, Ph.D, SpGK
NIP 19700821 1999 03 1 001

KEPUSTAKAAN

- Aberdam, D. (2008). "Epidermal stem cell fate: what can we learn from embryonic stem cells?" Cell Tissue Research **331**: 103-7.
- Ackerman, A. B., D. V. P.A, et al. (1993). "Neoplasma with follicular differentiation." Am J Surg Pathol **17 No. 12**: 1301-2.
- Adams, E. J., J. A. Green, et al. (1999). "Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining." J Clin Pathol **52**: 75-7.
- Arbiser, J. L. (2009). "Translating cyclooxygenase signaling in patch heterozygote mice into a randomized clinical trial in basal cell carcinoma." American Association for Cancer Research **24**: 1-6.
- Asada, M., F.-M. Schaart, et al. (1992). "Growth Characteristics and Differentiation of Basal Cell Carcinoma In Vitro - Immunohistochemical, Gel Electrophoretic, and Ultrastructural Analysis." Journal Invest Dermatol **99**: 474-81.
- Bader, R. S., S. L, et al. (2009). "Basal Cell Carcinoma." WebMD.
- Barankin, B., G. G, et al. (2009). "Nevoid basal cell carcinoma syndrome." WebMD: 1-3.
- Beer, T. W., P. Shepherd, et al. (2000). "Ber EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin." Histopathology **37**: 218-23.
- Bergman, A., P. Contard, et al. (2005). "Multiple Basal Cell Carcinoma in a Young Adult Treated with Imiuiomod 5% a Case Report and Literature Review." Journal of Drug in Dermatology.
- Blanpain, C. (2010). "Stem cells: Skin regeneration and repair." nature cell biology **12**.
- Blanpain, C., W. E. Lowry, et al. (2004). "Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche." Cell **118**: 635-48.
- Brakebusch, C. and R. Fassler (2005). " $\beta 1$ integrin function in vivo: Adhesion, migration and more." Cancer and Metastasis Reviews **24**: 403-11.
- Braun, K. M., C. Niemann, et al. (2003). "Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis." Development **130**: 5241-55.
- Castilho, R., C. Squarize, et al. (2007). "Requirement of Rac1 distinguishes follicular from interfollicular epithelial stem cells." Oncogene **26**: 5078-85.
- Chao, D. L., J. T. Eck, et al. (2008). "Preneoplastic lesion growth driven by the death of adjacent normal stem cells." PNAS **105 No. 39**: 15034-9.

- Charruyer, A., C. O. Barland, et al. (2009). "Transit-Amplifying Cell Frequency and Cell Cycle Kinetics Are Altered in Aged Epidermis." Journal of Investigative Dermatology **129**: 2574-83.
- Cohen, P., K. Schulze, et al. (2006). "Basal Cell Carcinoma with Mixed Histology : A Possible Pathogenesis for Recurrent Skin Cancer." PubMed **32 No. 4**: 542-51.
- Cotsarelis, G., T. T. Sun, et al. (1990). "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis." Cell **61(7)**: 1329-37.
- Crowson, A. N. (2006). "Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications." Modern Pathology **19**: 127-47.
- Dallaglio, K., A. Marconi, et al. (2012). "Survivin: a Dual Player in Healthy and Diseased Skin." Journal of Investigative Dermatology **132**: 18-27.
- Diest, P. J. v., P. v. Dam, et al. (1997). "A scoring system for immunohistochemical staining: consensus report of the task force for basic research of the EORTC-GCCG." J Clin Pathol **50**: 801-4.
- Donovan, J. (2009). "Review of the Hair Follicle Origin Hypothesis for Basal Cell Carcinoma." Dermatologic Surgery **35 No. 9**: 1311-23.
- El-Abaseri, T. B., J. Fuhrman, et al. (2005). "Chemoprevention of UV Light-Induced Skin Tumorigenesis by Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor." Cancer Research **65 No. 9**: 3958-65.
- Espada, J., I. Varela, et al. (2007). "Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice." The Journal of Cell Biology **181 No. 1**: 27-35.
- Fan, Y. S., R. A. Car, et al. (2007). "Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemical distinct from basal cell carcinoma." Histopathology **51**: 80-6.
- Fuchs, E. (2009). "Finding One's Niche in the Skin." Cell Stem Cell **4**: 499-502.
- Fuchs, E. and V. Horsley (2008). "More than one way to skin." GENES & DEVELOPMENT **22**: 976-85.
- Fuchs, E. and S. Raghavan (2002). "Getting Under The Skin Of Epidermal Morphogenesis." Genetics **3**: 100.
- Fuchs, E. and S. Raghavan (March 2002). "GETTING UNDER THE SKIN OF EPIDERMAL MORPHOGENESIS." Genetics **3**: 100.
- Gambardella, L. and Y. Barrandon (2003). "The multifaceted adult epidermal stem cell." Current Opinion in Cell Biology **15**: 771-7.

- Ghazizadeh, S. and L. B. Taichman (2001). "Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin." The EMBO Journal **20** No. 6: 1215-22.
- Ghazizadeh, S. and L. B. Taichman (2005). "Organization of Stem Cells and Their Progeny in Human Epidermis." Journal Invest Dermatol **124**: 367-72.
- Gho, C. G., J. E. F. Braun, et al. (2004). "Human follicular stem cells: their presence in plucked hair and follicular cell future." British Journal of Dermatology **150**: 860-68.
- Giangreco, A., M. Qin, et al. (2008). "Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging." Aging Cell **7** No. 2: 250-9.
- Goldberg, L. (1996). "Basal cell carcinoma." The Lancet **347**: 663-7.
- Goldberg LH (1996). "Basal Cell Carcinoma." Lancet **347**: 663-67.
- Gotoh, N. (2009). "Feedback inhibitor of the epidermal growth factor receptor signaling pathways." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **41**: 511-5.
- Green, H., K. Easley, et al. (2003). "Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells." PNAS **100** No. 26: 15625-30.
- Grinnell, K. L., B. Yang, et al. (2007). "De-Differentiation of Mouse Interfollicular Keratinocytes by the Embryonic Transcription Factor Oct-4." Journal of Investigative Dermatology **127**: 372-80.
- Grujil, F. R. d., H. J. v. Kranen, et al. (2001). "UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer." Journal of Photochemistry and Photobiology **63**(1-3): 19-27.
- Gur, G., C. Rubin, et al. (2004). "LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation." The EMBO Journal **23** No. 16: 3270-81.
- Halim, D., H. Mukti, et al. (2002). "Stem cell, dasar teori dan aplikasi . definisi dan biologi dasar stem cell."
- Hedman, H., J. Nilsson, et al. (2002). "Is LRIG1 a Tumour Suppressor Gene at Chromosome 3p14.3?" Acta Oncologia **41** No. 4: 352-54.
- Heenan, J. P. and M. S. Bogle (1993). "Eccrine differentiation in basal cell carcinoma." Journal of Investigative Dermatology **100** No. S1: 295S-9S.
- Henry, R. J. and A. B. Ackerman (1992). Structure and function of the skin : Development, morphology and physiology.
- Holbrook, K. A. and K. Wolff (1993). The Structure and Development of Skin.

- Horsley, V., A. O. Aliprantis, et al. (2008). "NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells." Cell **132**: 299-310.
- Hsu, S. Y., M. Kudo, et al. (2000). "The Three Subfamilies of Leucine-Rich Repeat-Containing G Protein-Coupled Receptors (LGR): Identification of LGR6 and LGR7 and the Signaling Mechanism of LGR7." Molecular Endocrinology **14 No. 8**: 1257-71.
- Inoue, K., N. Aoi, et al. (2009). "Differential expression of stem-cell-associated markers in human hair follicle epithelial cells." Laboratory Investigation **89**: 844-56.
- Ito, M., Y. Liu, et al. (2005). "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis." Nature Medicine **11**: 1351-4.
- Jacob, A. (1824). "Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face." Dublin Hospital Rep **4**: 232-9.
- Jensen, K. B., C. A. Collins, et al. (2009). "LRiG1 Expression Defines a Distinct Multipotent Stem Cell Population in Mammalian Epidermis." Cell Stem Cell **4 No. 5**: 427-39.
- Jensen, K. B. and F. M. Watt (2006). "Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: LRiG1 is a regulator of stem cell quiescence." PNAS **103 No. 32**: 11958-63.
- Jones, P. H., S. Harper, et al. (1995). "Stem cell patterning and fate in human epidermis." Cell **80 No. 1**: 83-93.
- Jones, P. H. and F. M. Watt (1993). "Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression." Cell **73 No. 4**: 713-24.
- Kasper, M., V. Jaks, et al. (2010). "Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes." Disease Models & Mechanisms **545(3)**: 545-56.
- Krahl, D. and K. Sellheyer (2010). "Sox9, more than a marker of the outer root sheath: spatiotemporal expression pattern during human cutaneous embryogenesis." Journal of Cutaneous Pathology **37**: 350-6.
- Krüger, K., U. Blume-Peytavi, et al. (1999). "Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle." Arch Dermatol Res **291**: 253-59.
- Laederich, M. B., M. Funes-Duran, et al. (2004). "The Leucine-rich Repeat Protein LRiG1 Is a Negative Regulator of ErbB Family Receptor Tyrosine Kinases." The Journal of Biological Chemistry **279 No. 45(November 5)**: 47050-6.
- Lajtha, L. G. (1979). "Stem Cell Concepts." Differentiation **14 No. 1-2**: 23-34.

- Latza, U., G. Niedobitek, et al. (1990). "Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelia." J Clin Pathol **43**: 213-19.
- Lavker, R. M. and P. Tung-Tien Sun (1983). "Epidermal stem cells." Dermatology **81** No. 1: 121-7.
- Legg, J., U. B. Jensen, et al. (2003). "Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human interfollicular epidermis." Development **130**: 6049-63.
- Lena, A., R. Shalom-Feuerstein, et al. (2008). "miR-203 represses 'stemness' by repressing $\Delta Np63$." Cell Death and Differentiation **15**: 1187-95.
- Lever, W. F. (1948). "PATHOGENESIS OF BENIGN TUMORS OF CUTANEOUS APPENDAGES AND OF BASAL CELL EPITHELIOMA." Arch Dermatol Res **57** No. 4: 679-708.
- Levi, F., L. Randimbison, et al. (1997). "Incidence of Invasive Cancers Following Squamous Cell Skin Cancer." American Journal of Epidemiology **146** No. 9: 734-9.
- Levy, V., C. Lindon, et al. (2007). "Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding." The FASEB Journal **21**: 1358-66.
- Li, A., P. J. Simmons, et al. (1998). "Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**: 3902-07.
- Liefer, K. M., M. I. Koster, et al. (2000). "Down-Regulation of p63 Is Required for Epidermal UV-B-induced Apoptosis." Cancer Research **60**: 4016-20.
- Luchi, S., S. Dabeistein, et al. (2006). "Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells." PNAS **103** No. 6: 1792-7.
- Marconi, A., K. Dallaglio, et al. (2007). "Survivin Identifies Keratinocyte Stem Cells and Is Downregulated by Anti- $\beta 1$ Integrin During Anoikis." STEM CELLS **25**: 149-55.
- Markey, A. C., E. B. Lane, et al. (1992). "Keratin expression in basal cell carcinoma." British Journal of Dermatology **126**: 154-60.
- Matsumura, Y. and H. N. Ananthaswamy (2002). "Molecular mechanisms of photocarcinogenesis." Front Biosci **7**: 765-83.
- McKee P H, Ed. (1996). Pathology of the skin with clinical correlation. London, Mosby-Wolfe.
- Medawar, A., T. Virolle, et al. (2008). " $\Delta Np63$ Is Essential for Epidermal Commitment of Embryonic Stem Cells." PLoS ONE **3**(10): 1-10.
- Mehregan, A. H. (1985). "The origin of the adnexal tumors of the skin: a viewpoint." J Cutan Pathol **12** No. 6: 459-67.

Mikaelian, I. and V. Wong (2003). "Follicular Stem Cell Carcinoma: Histologic, Immunohistochemical, Ultrastructural, and Clinical Characterization in 30 Dogs." Vet Pathol 40: 433-44.

Mimeault, M. and S. K. Batra (2010). "Recent advances on skin-resident stem/progenitor cell functions in skin regeneration, aging and cancers and novel anti-aging and cancer therapies." J. Cell. Mol. Med. 14 No. 1-2: 116-34.

Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2006). "Stem Cells and Their Niches." SCIENCE 311: 1880-5.

Muffler, S., H.-J. Stark, et al. (2008). "A Stable Niche Supports Long-Term Maintenance of Human Epidermal Stem Cells in Organotypic Cultures." Stem Cells 26: 2506-15.

Muzio, L. L. (2002). "Gorlin Syndrome or Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome." Orphanet: 1-10.

Nijhof, J. G. W., K. M. Braun, et al. (2006). "The cell-surface marker MTS24 identifies a novel population of follicular keratinocytes with characteristics of progenitor cells." Development 133: 3027-37.

Nilsson, J., A. Starefeldt, et al. (2003). "LRiG1 protein in human cells and tissues." Cell Tissue Research 312: 65-71.

Ohyama, M. (2009). "Hair Follicle Stem Cells-New Insights & Clinical Relevance."

Panda, S. (2010). "Nonmelanoma skin cancer in India." Indian Journal of Dermatology 55 No. 4: 373-8.

Pellegrini, G., E. Dellambra, et al. (2001). "p63 identifies keratinocyte stem cells." PNAS 98 No. 6: 3156-61.

Pincelli, C. and A. Marconi (2010). "Keratinocyte Stem Cells: Friends and Foes." Journal of Cellular Physiology: 310-15.

Pinkus, G. S. and P. J. Kurtin (1985). "Epithelial membrane antigen diagnostic discriminant in surgical pathology : immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies." Hum. Pathol 16: 929-40.

Piwko-Czuchra, A., H. Koegel, et al. (2009). "b1 Integrin-Mediated Adhesion Signalling Is Essential for Epidermal Progenitor Cell Expansion." PLoS ONE 4(5).

Prakoeswa, C. R. S. (1990). "Peran P53 pada pathogenesis karsinoma sel basal." Berkala Ilmu Kesehatan Kulit & Kelamin 20 No. 3: 261-5.

Puri, T., G. Gunabushanam, et al. (2006). "Extensive bone metastases from basal cell carcinoma of the eye." Singapore Med 47 No. 9: 811-3.

- Qin, J.-Z., V. Chaturvedi, et al. (2002). "Regulation of apoptosis by p53 in UV-irradiated human epidermis, psoriatic plaques and senescent keratinocytes." Oncogene **21**: 2991-3002.
- Ramsey, M. L. (2010). "Basal Cell Carcinoma." WebMD: 1-4.
- Rass, K. and J. Reichrath (2008). "UV Damage and DNA Repair in Malignant Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer." PubMed **624**: 162-78.
- Ray, A., A. Basu, et al. (2010). "Plesiotherapy for non-melanoma skin cancer: innovating to overcome!" Indian Journal of Dermatology **55** No. 4: 363-6.
- Requena, L., M. d. C. Farina, et al. (1999). "Multiple Hereditary Infundibulocystic Basal Cell Carcinomas." Arch Dermatol Res **135**: 1227-35.
- Rubin, A. I. (2005). "Basal-Cell Carcinoma." N Engl J. Med. **353**: 2262-9.
- Sajjiadian, A., M. Barakat, et al. (2010). "Skin Cancer - Basal cell carcinoma." WebMD: 1-3.
- Santacroce, L., L. Diomedede, et al. (2008). "Epitheliomas, Basal Cell. Contributor Information and Disclosures. Cell Carcinoma " WebMD: 1-3.
- Segatto, O., S. Anastasi, et al. (2011). "Regulation of epidermal growth factor receptor signalling by inducible feedback inhibitors." Journal of Cell Science **124**: 1785-93.
- Sellheyer, K. (2011). "Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis, and stem cell markers." British Journal of Dermatology.
- Sellheyer, K. and D. Krahl (2010). "Cutaneous mesenchymal stem cells: status od current knowledge, implicatons for dermatopathology." The Journal of Pathology **37**: 624-34.
- Senoo, M., F. Pinto, et al. (2007). "p63 Is Essential for the Proliferative Potential of Stem Cells in Stratified Epithelia." Cell **129**: 523-36.
- Shipitsin, M. and K. Polyak (2008). "The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance." Laboratory Investigation **88**: 459-63.
- Snippert, H. J., A. Haegebarth, et al. (2010). "LGR6 Marks Stem Cells in the Hair Follicle That Generate All Cell Lineages of the Skin." SCIENCE **327**: 1385-8.
- Soehnge, H., A. Ouhtit, et al. (1997). "Mechanisms of Induction of Skin Cancer." PubMed **2(44)**: d538-51.
- Soter, N. A. (1990). "Acute Effects of Ultraviolet Radiation on the Skin." PubMed **9** No. 1: 11-5.
- Sotiropoulou, P. A., A. Candi, et al. (2008). "The Majority of Multipotent Epidermal Stem Cells Do Not Protect Their Genome by Asymmetrical Chromosome Segregation." STEM CELLS **26**: 2964-73.

- Stefano, I. D., G. F. Zannoni, et al. (2011). "Cytoplasmic expression of estrogen receptor beta (ER β) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer." Gynecologic Oncology **122**: 573-79.
- Stojadinovic, O., M. Ito, et al. (2011). "Hair Cycling and Wound Healing: To Pluck or Not to Pluck." Journal of Investigative Dermatology **131**: 292-4.
- Swanson, P. E., M. M. Fitzpatrick, et al. (1998). "Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens." J Cutan Pathol **25 No. 3**: 153-9.
- Tang, J. Y., T. Z. Xiao, et al. (2010). "Vitamin D3 Inhibits Hedgehog Signaling and Proliferation in Murine Basal Cell Carcinomas." Cancer Prevention Research **3**: 25-34.
- Teh, M.-T., S.-T. Wong, et al. (2002). "FOXO1 is a Downstream Target of Gli1 in Basal Cell Carcinomas." Cancer Research **62 No. 16**.
- Tellechea, O., M. D. J.P. Reis, et al. (1993). "Monoclonal antibody BerEP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous-cell carcinoma of the skin." The American Journal of Dermatopathology **15 No. 5**: 452-5.
- Tiberio, R., A. Marconi, et al. (2002). "Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner." FEBS Letters **524**: 139-44.
- Tilli, C. M. L. J., M. A. M. V. Steensel, et al. (2005). "Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma." British Journal of Dermatology **152**: 1108-24.
- Tjarta, A. (1995). "Spektrum Kanker Kulit di Indonesia MDVI." **3 No. 22**.
- Uzquiano, M. C., V. G. Prieto, et al. (2008). "Metastatic basal cell carcinoma exhibits reduced actin expression." Modern Pathology **21**: 540-3.
- Venza, I., L. Giordano, et al. (2001). "Prostaglandin E2 signalling pathway in human T lymphocytes from healthy and conjunctiva basal cell carcinoma-bearing subjects." Immunology and Cell Biology **79**: 482-9.
- Watt, F. M., C. L. Celso, et al. (2006). "Epidermal stem cells: an update." Current Opinion in Genetics & Development **16**: 518-24.
- Widgerow, A. D. and T. Christofides (2006). "Morpheic basal cell carcinoma: transformation or original pathology?" The Internet Journal of Plastic Surgery **2 No. 2**: 1528-8293.
- Winters, R., S. Naud, et al. (2008). "Ber-EP4, CK1, CK7 and CK14 are useful markers for basaloid squamous carcinoma: a study of 45 cases." Head Neck Pathol **2 No. 4**: 265-71.

Youn, J. L., R. W. Gange, et al. (1988). "Effect of hypoxia on sunburn cell formation and inflammation induced by ultraviolet radiation." Photodermatol **5** No. 6: 252-6.

Youssef, K. K., A. V. Keymeulen, et al. (2010). "Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma." nature cell biology **12** No. 3: 299-305.

Youssef, K. K., A. V. Keymeulen, et al. (2010). "Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma." nature cell biology **12** No. 3: 299-305.

Yu, H., S. M. Kumar, et al. (2010). "Stem Cells with Neural Crest Characteristics Derived from the Bulge Region of Cultured Human Hair Follicles." Journal of Investigative Dermatology **130**: 1227-36.

Yu, L., A. Galan, et al. (2009). "Caveats in BerEP4 staining to differentiate basal and squamous cell carcinoma." Journal of Cutaneous Pathology **36**: 1074-6.

Zackheim, H. S. (1962). "Origin of the human basal cell epithelioma." The Journal of Investigative Dermatology **40**: 283-97.

Zhang, W., E. Remenyik, et al. (2001). "Escaping the stem cell compartment: Sustained UVB exposure allows p53-mutant keratinocytes to colonize adjacent epidermal proliferating units without incurring additional mutations." PNAS **98** No. 24: 13948-53.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Sejarah Penelitian sel Origin KSB

NO	Year	Author	Title
1	1903	Krompecher E	Basal cell layer of the interfollicular epidermis
2	1935	Geschicker	Sel Basal yang berdiferensiasi menjadi sel glanduler
3	1948	Lever	Follicular origin, derives from the incompletely differentiation cells of the primer epithelial hair germ
4	1950	Wallce Halper	KSB berasal dari germinativum embrinik sel epitel (embrionik primary epithelial germ cell) atau dari folikel rambut
5	1953	Pinkus	Sel origin KSB berasal dari sel Pluripoten
6	1963	Zackheim	Interfollicular epidermis
7	1974	Foot NC	KSB berasal dari matriks rambut atau primordial adneksa dermal
8	1991	Lane et all	CK 19 (0-100%) is not a specific stem cell marker as CK15 and likely stains transient amplifying cells also : not a stem cell marker
9	1993	Asada	Cytokeratin profile : identical ORS, and distinct that from the interfollicular epidermis
10	1994	Ponten	Bcc stromal compart. stomal tissues with PDGF (Platelet derived growth factor
11	1998	Lyle et al	Folikuler stemm cell marker (DAKO clone C8-anti CD8 monoclonal antibody /144B) with cytokeratin 15: LHK15 clone detected CK15 in 65=71% BCC. CD8/144B : 27%
12	1999	Chiang	Disrupt sonic hedgehog gen : arrest of hair follicle, striking morphological resemblance BCC superficial. constitutive activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling hairless mice induced superficial BCC like downgrowths resembling embryonic hair germs. a. human embryonic hair germ show an expression pattern for β catennin identical to that of BCC
13	1999	Sato	Sonic hedgehog cDNA induces an increase hair size.
14	1999	Kruger et al	Vellus hair origin (based) antigen : cytokeratin and lectins.
15	2001	Ackerman et al	Follicular germinative cells. by electrone microscope studies
16	2006	Athar M	Basic science studies, sonic hedgehog pathway : central "dual " : importance for development BCC and follicular morphogenesis
17	2008	Yang	Smoothed mutants (SmoM2) a member of hedgehog pathway . activation SmoM2 in bulge cells hair follicle didnot induced BCC. BC C was found to be formed from long lived resident progenitor cells of the interfollicular epidermis and the upper follicular infundibulum.
18	2010	Youssef et al	BCC derives from stem cells in the basal cell layer of the interfollicular epidermis which have the potential to develop into hair germ like structure
19	2010	Sellheyer K	Expression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as well as SOX9. resemblance to embryonic hair germ

Lampiran 2

A. DISKRIPSI KASUS-KASUS KSB

Tabel 4. Diskripsi Demografi kasus KSB

No	Variabel	N	Persentase
1	Jenis Kelamin		
	Laki-Laki	13	56.52
	Perempuan	10	43.48
2	Tahun		
	2010	7	30.43
	2011	16	69.57
3	Umur (Mean $\pm$ SD))	68.73[14.36]	
4	Lokasi		
	Face	6	26.09
	Ankle	2	8.7
	Back	2	8.7
	Lower Leg	2	8.7
	Neck	2	8.7
	Nose	2	8.7
	Scalp	2	8.7
	Shoulder	2	8.7
	Upper Leg	1	4.35
	Chest	1	4.35

Jumlah kasus yang terlibat dalam penelitian ini yaitu sebanyak 23 kasus : diperoleh 7 kasus stadium dini pada tahun 2010 dan 16 kasus dari tahun 2011. Terdiri dari 57% Laki-laki dan 43% perempuan. Umur pasien yang dijadikan sampel penelitian ini rata-rata sebesar 69 tahun dengan standar deviasi 14.36 dengan usia termuda 44 tahun dan usia tertua 88 tahun. Lokasi lesi terbanyak pada daerah wajah 26%.

Tabel 5. Diskripsi Demografi Pasien dan Karakteristik Basal KSB

Variabel	n	Persen
Nodul	3	13.04
Superfisial	20	86.96

Dari 23 kasus terdapat 3 kasus bentuk nodul dan 20 kasus bentuk superfisial

Tabel 6 :Histogenesis perbandingan lokasi lesi pada basal dengan basal dan folikel

Teori	Basal	Basal dan Folikel	Folikel	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	
Baru	17 (73.91%)	6 (26.09)	0 (0%)	23
Lama	0 (0%)	0 (0%)	23 (100%)	23

Pearson chi2(2)=46.00

P value=0.000

Tabel 6 diatas memberi gambaran dari 23 kasus,17 kasus mempunyai lesi pada lapisan basal (73,91%) dan 6 kasus mempunyai lesi campuran lesi basal dan folikel (26,09%)

Tabel 7. Gambaran Bentuk Basal dan Folikel dengan pewarnaan BerEP4

No	Variabel	N	Percent
1	Bentuk Basal_Folikel		
	Basal	380	96.45
	Folikel	14	3.55
2	Basal_folikel		
	Basal <15	22	5.58
	Basal 16-30	33	8.38
	Basal >30	325	82.49
	Folikel Rambut ≤15	9	2.28
	Folikel Rambut >15	5	1.27
3	Bentuk		
	Non-nodul	377	95.69
	Nodul	17	4.31

Tabel 7 diatas menunjukkan jumlah lesi sebanyak 380 pada daerah basal dan 14 lesi pada folikel. Terlihat juga lesi sangat dini dengan jumlah < 15 sel terdapat pada daerah basal epidermis, 16-30 sel, dan > 30 sel terdapat pada daerah basal epidermis dengan total lesi 380. Sedangkan pada daerah folikel rambut hanya terdapat 14 lesi.

Tabel 8 : Hubungan antara intensitas warna pada pewarnaan LGR6 dengan kontrol Intensitas |Warna LGR6

Lesi KSB	normal sel		Total
	kontrol	KSB	
Negatif	15 65.22	89 22.59	104 24.94
Positif	8 34.78	305 77.41	313 75.06
Total	23 100.00	394 100.00	417 100.00

Pearson $\chi^2(1) = 21.0952$ Pr = 0.000

Dari hasil analisa di atas terlihat bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara Intensitas Warna pada kelompok kontrol dengan KSB. Nilai P value sebesar 0.000. Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok Kontrol, intensitas warna LGR6 lebih banyak yang negatif (intensitas warna 0 dan 1); sedangkan pada kelompok KSB, intensitas warna banyak yang positif (intensitas warna 2 dan 3).

Tabel 9: 2x2 Uji Chi2 Perbedaan Intensitas Warna LGR6 Lesi KSB Oleh observer kedua pada kelompok kontrol dengan KSB.

Intensitas Warna Lesi KSB	Observer pertama			Observer kedua		
	kontrol	KSB	Total	kontrol	KSB	Total
Negatif (n)	15	89	104	15	80	95
%	65.22	22.59	24.94	65.22	20.3	22.78
Positif (n)	8	305	313	8	314	322
%	34.78	77.41	75.06	34.78	79.7	77.22
Total (n)	23	394	417	23	394	417
%	100	100	100	100	100	100

P value = 0.000 $\chi^2=21.09$

P Value=0.000 $\chi^2=24.91$

Demikian juga hasil analisa di atas terlihat bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara intensitas warna pada kelompok kontrol dengan KSB. Nilai P value sebesar 0.000 . Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok kontrol, intensitas warna LGR6 lebih banyak yang negatif (intensitas warna 0 dan 1); sedangkan pada kelompok kasus, intensitas warna banyak yang positif (intensitas warna 2 dan 3)

Hubungan antara perbedaan persentase positif LGR6 pada KSB dan Kontrol.

Tabel 10: Uji T-test persentase positif antibodi LGR6 pada Kasus dan KSB dengan penilaian oleh *observer* pertama

Tabel 11: *Two-sampelt test with equal variances*

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Kontrol	23	0	0	0	0	0
Kasus	394	95.73604	.7207461	14.3064	94.31904	97.15304
combined	417	90.45564	1.269592	25.92581	87.96002	92.95125
diff		-95.73604	2.986473		-101.6065	-89.86554
diff = mean(Control) - mean(Cases)		t = -32.0566				
Ho: diff = 0		degrees of freedom = 415				
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.0000		Pr(T > t) = 0.0000		Pr(T > t) = 1.0000		

Hasil penilaian Uji T-Test menunjukkan adanya hubungan perbedaan yang bermakna persentase positif antibodi LGR6 pada KSB dan kontrol dengan P value 0.000. Pada kelompok KSB, rata-rata persentase positif sebesar 95.73% dengan standar deviasi 14.3, sedangkan pada kelompok kontrol persentase 0, tidak ditemukan sel KSB yang terwarnai

Tabel11: Uji T-test persentase positif antibodi LGR6 pada KSB dan Kontrol dengan penilaian oleh *observer* kedua

Two-sampelt test with equal variances

Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Control	23	0	0	0	0	0
Cases	394	95.07868	.7089655	14.07256	93.68484	96.47252
combined	417	89.83453	1.257425	25.67734	87.36283	92.30623
diff		-95.07868	2.937659		-100.8532	-89.30413
diff = mean(Control) - mean(Cases)		t = -32.3655				
Ho: diff = 0		degrees of freedom = 415				
Ha: diff < 0		Ha: diff != 0		Ha: diff > 0		
Pr(T < t) = 0.0000		Pr(T > t) = 0.0000		Pr(T > t) = 1.0000		

Hasil penilaian Uji T-Test menunjukkan adanya hubungan perbedaan yang bermakna persentase antibodi LGR6 pada KSB dan kontrol dengan P value 0.000. Pada kelompok KSB, rata-rata persentase positif sebesar 95.0% dengan standar deviasi 14.07, sedangkan pada kelompok Kontrol persentase 0. Dari kedua *observer* terlihat bahwa rata-rata lesi positif dengan Ab LGR6 sebesar 95,36% sedangkan tidak terdapat sel KSB pada lapisan basal normal

ANALISIS KORELASI ANTAR Score LGR6 Lesi KSB dan basal, LRIG1 lesi dan basal antara kedua *observer*

Tabel 12. Korelasi antara Lesi KSB dan Basal oleh kedua *observer*

Korelasi Total Scor	r	P value
LGR6 Lesi KSB <i>observer</i> 1&2	0.8516	0.0000
LRIG1 Lesi KSB <i>observer</i> 1 & 2	0.9534	0.0000
LRIG1 Basal <i>observer</i> 1 & 2	0.803	0.0000
LGR6 Basal <i>observer</i> 1 & 2	1	0.0000

Dari hasil analisis korelasi di atas terlihat bahwa semua penilaian mempunyai hubungan yang sangat kuat dan bermakna antara penilaian oleh *observer* pertama dan kedua. Semua nilai P value sebesar 0.000 dan Nilai r lebih besar dari 0.8 artinya terdapat hubungan yang kuat antara penilaian kedua *observer*.

Tabel 3. Uji Chi2 Perbedaan Intensitas Warna LGR6 Lesi KSB oleh *observer* pertama dan kedua pada kelompok kontrol dengan KSB.

Intensitas Warna	Observer pertama			Observer kedua		
Lesi KSB	kontrol	KSB	Total	kontrol	KSB	Total
Negatif (n)	15	89	104	15	80	95
%	65.22	22.59	24.94	65.22	20.3	22.78
Positif (n)	8	305	313	8	314	322
%	34.78	77.41	75.06	34.78	79.7	77.22
Total (n)	23	394	417	23	394	417
%	100	100	100	100	100	100
P value =0.000			P Value=0.000			
Chi2=21.09			Chi2=24.91			

Demikian juga hasil analisis di atas terlihat bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara Intensitas Warna pada kelompok kontrol dengan KSB. Nilai P value sebesar 0.000. Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok kontrol, intensitas warna LGR6 lebih banyak yang negatif (intensitas warna 0 dan 1); sedangkan pada kelompok KSB, intensitas warna banyak yang positif (intensitas warna 2)

Hubungan antara perbedaan persentase positif LGR6 pada KSB dan Kontrol.

Tabel 14. Uji T-test persentase positif intensitas warna LGR6 dan LRIG1 pada Kasus dan Kontrol dengan penilaian oleh kedua *observer*

Diagnosis	Observer pertama			Observer kedua		
	Mean ± SD	95% CI	P value	Mean ± SD	95% CI	P value
% Intensitas Warna LGR6						
Kontrol	0 ± 0	0-0	0.0000	0 ± 0	0-0	0.0000
KSB	95.73 ± 14.30	94.32-97.15		95.07 ± 14.07	93.68-96.47	
% Intensiten Warna LRIG1						
Kontrol	77.82 ± 36.55	62.02-93.63	0.0221	69.56 ± 41.93	51.43-87.70	0.0011
KSB	91.14 ± 26.40	88.53-93.76		89.64 ± 27.58	86.91-92.37	

Hasil penilaian oleh *observer* pertama dengan Uji T-Test menunjukkan adanya hubungan perbedaan yang bermakna persentase intensitas warna LGR6 pada KSB dan Kontrol dengan P value 0.000. Pada kelompok KSB, rata-rata persentase positif sebesar 95.73% dengan standar deviasi 14.3, sedangkan pada kelompok Kontrol persentase intensitas warnanya 0.

Hasil penilaian oleh *observer* kedua dengan Uji T-Test menunjukkan adanya hubungan perbedaan yang bermakna persentase intensitas warna LGR6 pada kasus dan kontrol dengan P value 0.000. Pada kelompok kasus, rata-rata persentase positif sebesar 95.0% dengan standar deviasi 14.07, sedangkan pada kelompok kontrol persentase intensitas warnanya 0.

Demikian halnya dengan Persentase warna LRIG1 Basal, terlihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara KSB dan Kontrol pada *observer* pertama (P value=0.0221) dan pada *observer* kedua (P value=0.0011)

Tabel 15. Distribusi persentase intensitas warna sel-sel KSB dan sel-sel basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua *observer*.

Intensitas Warna	Observer I		Observer II		GAbungan Rata-rata	
	n	Percent	n	Percent	n	Percent
LGR6 Lesi KSB						
0	4	1.02	0	0	2	0.51
1	85	21.57	80	20.3	83	20.935
2	181	45.94	223	56.6	202	51.27
3	124	31.47	91	23.1	108	27.285
LRIG1 Lesi KSB						
0	26	6.6	26	6.6	26	6.6
1	171	43.4	171	43.4	171	43.4
2	99	25.13	114	28.93	107	27.03
3	98	24.87	83	21.07	91	22.97
LRIG1 Basal						
0	3	13.04	5	21.74	4	17.39
1	17	73.91	15	65.22	16	69.565
2	2	8.7	3	13.04	3	10.87
3	1	4.35	0	0	1	2.175
LGR6 Basal						
1	15	65.22	15	65.22	15	65.22
2	8	34.78	8	34.78	8	34.78

Dari tabel 15. terlihat bahwa penilaian oleh *observer* pertama pada LGR6 Lesi KSB hampir setengahnya (45.9%) mempunyai intensitas warna 2, sedangkan penilaian yang dilakukan oleh *observer* kedua 56.6%. Akan tetapi pada LRIG1 Lesi KSB sebagian besar (43%) mempunyai intensitas warna 1. Demikian halnya dengan LRIG1 Basal lebih dari 70% mempunyai intensitas warna 1, dan pada LGR6 Basal sebagian besar (65%) mempunyai intensitas warna 1.

HASIL ANALISIS KAPPA TEST

Tabel 16 *Diagnostic intraobserver agreement*

Diagnosis	Kappa	Agreement%	Probe>Z
Intensitas warna LGR6 Lesi KSB	0.5685	73.1	0.0000
Intensitas warna LRIG1 Lesi KSB	0.8326	88.58	0.0000
Intensitas warna LRIG1 Basal	0.5455	52.17	0.0001
Intensitas warna LGR6 Basal	1.0000	100	0.0000
Persentase Intensitas Warna LGR6 KSB	0.512	93.65	0.0000
Persentase Intensitas Warna LRIG1 KSB	0.7672	95.43	0.0000
Persentase Intensitas Warna LRIG1 Basal	1.000	100	0.0000
Persentase Intensitas Warna LGR6 Basal	1.0000	100	0.0000
Total Scor LGR6 Lesi KSB	0.5975	73.86	0.0000
Total Scor LRIG1 Les KSB	0.8004	86.29	0.0000
Total Scor LRIG1 Basal	0.5455	52.17	0.0001
Total Scor LGR6 Basal	1.0000	100	0.0000

Dari hasil analisis di atas terlihat bahwa intensitas warna LGR6 Lesi KSB mempunyai nilai Kappa sebesar 0.56 dan pada LRIG1 Basal 0.5455 artinya kesepakatan penilaian bersifat *moderate*, demikian halnya juga dengan persentase intensitas warnanya. *Percent agreement* intensitas warna LRIG1 Lesi KSB bersifat *excellent* dengan nilai kappa sebesar 0.83. Hasil uji kappa test di atas antara intensitas lesi LGR6 antara penilaian oleh *observer* pertama dan kedua semuanya menunjukkan nilai kappa sebesar 1 dan *persentase agreement* yang sangat tinggi yaitu sebesar 100%. Angka kappa yang paling tinggi yaitu sebesar 1.00 artinya tingkat kesepakatan dua *observer* sangat *reliable/konsisten*.

Tabel 17 Distribusi Persentase sel-sel KSB dan Basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1, diperiksa oleh *Observer pertama*

Intensitas Warna	<i>Observer pertama</i>							
	LGR6 KSB		LRIG1 KSB		LRIG1 Basal		LGR6 Basal	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<20%	4	1.02	28	7.11	23	100	23	100
20-49.9%	4	1.02	3	0.76	0	0	0	0
50-79.9%	16	4.06	8	2.03	0	0	0	0
≥80%	370	93.91	355	90.1	0	0	0	0

Tabel 18 Distribusi Persentase sel-sel KSB dan Basal yang positif dengan antibodi LGR6 dan LRIG1, diperiksa oleh *Observer kedua*

Intensitas Warna	<i>Observer kedua</i>							
	LGR6 KSB		LRIG1 KSB		LRIG1 Basal		LGR6 Basal	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<20%	9	2.28	28	7.11	23	100	23	100
20-49.9%	0	0	9	2.28	0	0	0	0
50-79.9%	21	5.33	8	2.03	0	0	0	0
≥80%	364	92.39	349	88.58	0	0	0	0

Dari hasil analisis tabel 14 dan 15 diatas terlihat untuk antibodi LGR6, lesi KSB 90,1-93,91% positif, sedangkan pada daerah kontrol, lapisan basal epidermis, tidak ditemukan adanya sel-sel KSB yang positif. Demikian juga dengan antibodi LRIG1, sel-sel KSB pada lesi positif 88.58 – 92,39%, dan tidak ditemukan sel-sel KSB pada daerah kontrol lapisan basal epidermis

Tabel 19 Distribusi Total Score Intensitas Warna dan Persentase sel-sel KSB yang terwarnai oleh antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua *observer*

Intensitas Warna	Observer I		Observer II	
	n	Percent	n	Percent
LGR6 Lesi KSB				
0	4	0.96	0	0
1	15	3.6	15	3.6
2	8	1.92	8	1.92
4	6	1.44	12	2.88
5	95	22.78	90	21.58
6	175	41.97	205	49.16
7	114	27.34	87	20.86
LRIG1 Lesi KSB				
0	29	6.95	31	7.43
2	2	0.48	1	0.24
3	0	0	2	0.48
4	9	2.16	4	0.96
5	186	44.6	191	45.8
6	94	22.54	111	26.62
7	97	23.26	77	18.47
LRIG1 Basal				
0	3	13.04	5	21.74
1	17	73.91	15	65.22
2	2	8.7	3	13.04
3	1	4.35	0	0
LGR6 Basal				
1	15	65.22	15	65.22
2	8	34.78	8	34.78

Dari tabel 19 terlihat sel-sel KSB mengekspresikan marker antibodi LGR6 dan LRIG1 bervariasi, dari yang tanpa ekspresi sampai ekspresi kuat. Pada kelompok kontrol lapisan basal epidermis marker antibodi terhadap LGR6 dan LRIG1 adalah lemah.

Tabel 20 Distribusi Kategori Ekspresi Total Score Intensitas Warna dan Persentase sel-sel KSB yang terwarnai antibodi LGR6 dan LRIG1 oleh kedua *observer*

Intensitas Warna	Observer I		Observer II	
	n	Percent	n	Percent
LGR6 Lesi				
0	4	1.02	0	0
1 sd 3	0	0	0	0
4 sd 5	101	25.63	102	25.89
6 sd 7	289	73.35	292	74.11
LRIG1 Lesi				
0	26	6.6	26	6.6
1 sd 3	2	0.51	3	0.76
4 sd 5	177	44.92	179	45.43
6 sd 7	189	47.97	186	47.21
LRIG1 Basal				
0	3	13.04	5	21.74
1 sd 3	20	86.96	18	78.26
LGR6 Basal				
1 sd 3	23	100	23	100

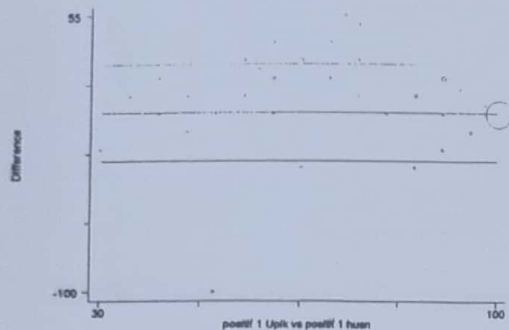
- Kategori 0 "Tidak ada Ekspresi"
- Kategori 1 sd 3 "Ekspresi Lemah"
- Kategori 4 sd 5 "Ekspresi Sedang"
- Kategori 6 sd 7 "Ekspresi Kuat"

Dari tabel 20 terlihat Hasil penelitian terhadap Ab LRIG1 menunjukkan lesi KSB mengekspresikan marker protein bervariasi : tanpa ekspresi 26%, ekspresi lemah 0,51-0,76%, ekspresi sedang 45,43-44,92% dan ekspresi kuat 47,21-47,97%. Pada daerah kontrol lapisan basal epidermis dari tanpa ekspresi sampai ekspresi lemah. Antibodi LRIG1 positif mewarnai sitoplasma sel KSB dan beberapa inti sel lapisan epidermis.

Untuk Ab LGR6 menunjukkan lesi KSB mengekspresikan marker protein bervariasi : tanpa ekspresi 1,02%, ekspresi sedang 25,63-25,63% dan ekspresi kuat 73,35-74,11%. LGR6 positif mewarnai sitoplasma sel KSB dan beberapa inti sel lapisan epidermis. Pada daerah kontrol lapisan basal epidermis hanya mengekspresi lemah di sel basal normal epidermis.

ANALISIS Bland Alman

1.a Hubungan antara Intesitas Warna LGR6 Upik dengan Husni

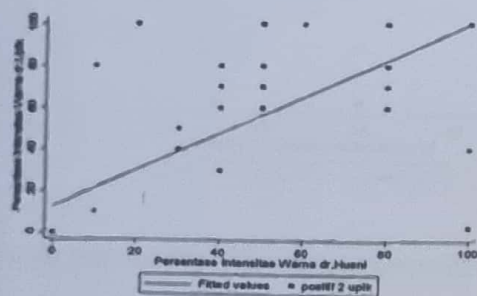


Grafik Bland Alman LGR6 Lesi KSB Intensitas Warna kedua *observer*

```
. baplot pos1_u pos1_h, avlAb ("positif 1 Upik vs positif 1 husni")
Bland-Altman comparison of pos1_u and pos1_h
Limits of agreement (Reference Range for difference): -26.357 to 27.672
Mean difference: 0.657 (CI -0.680 to 1.995)
Range : 30.000 to 100.000
Pitman's Test of difference in variance: r = 0.020, n = 394, p = 0.697
```

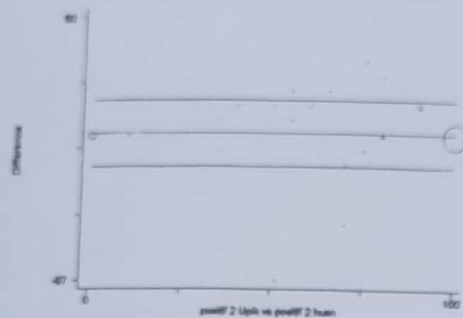
Dari grafik Bland Almont di atas terlihat bahwa nilai persentase positif intensitas warna antar penilaian yang diberikan oleh dr. Upik dengan dr. Husni menunjukkan angka kesamaan yang cukup bagus. Walaupun grafik menunjukkan ada beberapa penilaian yang sangat berbeda antara dr. Upik dengan dr. Husni, hasil bland almont test menunjukkan nilai perbedaan variance (nilai r) sebesar 0.02. Artinya perbedaan penilaian intraobserver hanya menunjukkan perbedaan yang sangat kecil; dan range dari 30 sampai dengan 100.

2.a. Hubungan antara Positif LRIG1 Lesi KSB Upik dengan Husni



Grafik Scatter Plot Persentase Intensitas Warna LRIG1 dr. Upik dengan dr. Husni

2.b. Hubungan antara Intesitas Warna LRIG1 Lesi KSB antara 2 observer

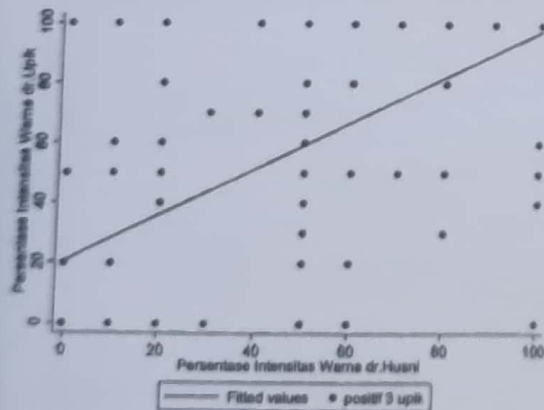


Grafik Bland Alman LRIG1 Intensitas Warna dr. Upik dengan dr. Husni

baplot pos2_u pos2_h, avlAb ("positif 2 Upik vs positif 2 husni")
 Bland-Altman comparison of pos2_u and pos2_h
 Limits of agreement (Reference Range for difference): -20.876 to 23.887
 Mean difference: 1.505 (CI 0.397 to 2.613)
 Range : 0.000 to 100.000
 Pitman's Test of difference in variance: $r = -0.108$, $n = 394$, $p = 0.034$

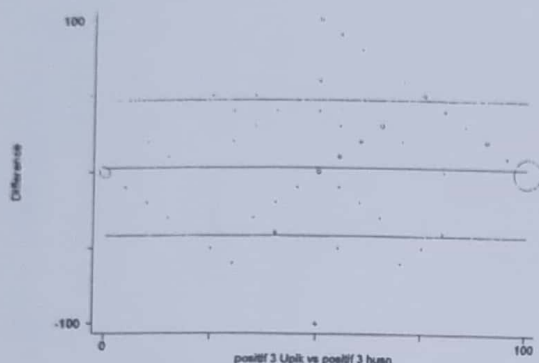
Dari grafik bland alman di atas terlihat bahwa perbedaan antara penilaian persentase intensitas warna LRIG1 masih berada di dalam batas yang normal. Memang ada beberapa penilaian yang berada di luar area batas perbedaan, tetapi perbedaan yang ada hanya sedikit. Hal ini ditunjukkan oleh nilai r sebesar -0.108 .

3.a. Hubungan antara Positif LRIG1 Lapisan Basal dr. Upik dengan dr. Husni



Grafik Scatter Plot Persentase Intensitas Warna LRIG1 Lesi Basal antara 2 observer

3.b. Hubungan antara Intesitas Warna LRIG1 Lesi KSB dr. Upik dengan dr. Husni



Grafik Bland Altman LRIG1 Lapisan Basal Intensitas Warna dr. Upik dengan dr. Husni

. baplot pos3_u pos3_h, avlAb ("positif 3 Upik vs positif 3 husni")

Bland-Altman comparison of pos3_u and pos3_h

Limits of agreement (Reference Range for difference): -41.957 to 47.135

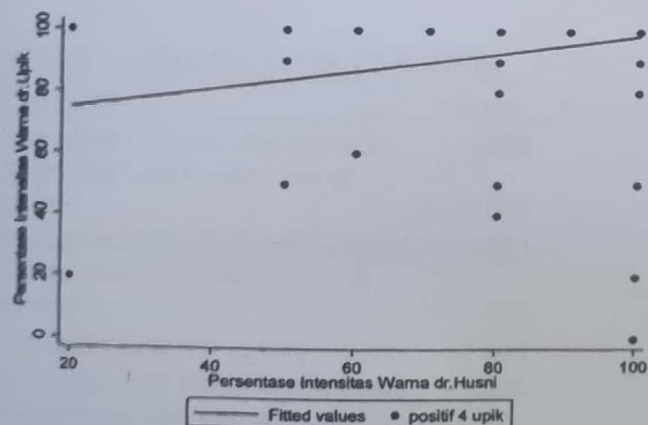
Mean difference: 2.589 (CI 0.383 to 4.795)

Range : 0.000 to 100.000

Pitman's Test of difference in variance: $r = -0.051$, $n = 394$, $p = 0.315$

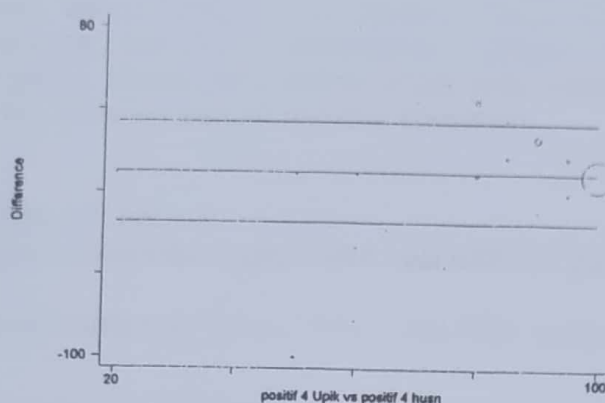
Dari grafik di atas terlihat bahwa bahwa range perbedaan penilaian masih banyak yang berada di batas perbedaan. Nilai r (perbedaan variance) masih kecil yaitu sebesar -0,051.

4.a. Hubungan antara Positif LGR6 dr. Upik dengan dr. Husni



Grafik Scatter Plot Hubungan antara Positif Intensitas Warna LGR6 kedua observer

4.b. Hubungan antara Intesitas Warna LGR6 Lapisan Basal antara 2 *observer*.



Scatter Plot Hubungan antara Intesitas Warna LGR6 Lapisan Basal kedua *observer*

. baplot pos4_u pos4_h, aviAb ("positif 4 Upik vs positif 4 husni")

Bland-Altman comparison of pos4_u and pos4_h

Limits of agreement (Reference Range for difference): -26.353 to 28.185

Mean difference: 0.916 (CI -0.436 to 2.268)

Range : 20.000 to 100.000

Pitman's Test of difference in variance: $r = 0.151$, $n = 393$, $p = 0.003$.

Dari grafik Bland Alman di atas terlihat bahwa mayoritas sebaran nilai mean dan perbedaan nilai masih berada di ambang batas perbedaan yang wajar. Variasi perbedaan nilai r sebesar 0.151, artinya hasil kedua *observer* tidak berbeda jauh.

Tabel 20: ANALISIS DATA 23 SAMPEL

Diagnosis	Kappa	Agreement%	Probe>Z
Intensitas Lesi Kiri Upik vs Husni	1.000	100	0.0000
Intensitas Lesi Kanan Upik vs Husni	1.000	100	0.0000
Persentase Lesi Kiri Upik vs Husni	1.000	100	0.0000
Persentase Lesi Kanan Upik vs Husni	1.000	100	0.0000
Intensitas Lesi Kiri vs kanan Upik	1.000	100	0.0000
Intensitas Lesi Kiri vs kanan Husni	1.000	100	0.0000
Persentase Lesi Kiri vs kanan Upik	1.000	100	0.0000
Persentase Lesi Kiri vs kanan Husni	1.000	100	0.0000

Hasil uji kappa test di atas antara intensitas lesi kiri antara penilaian kedua *observer* semuanya menunjukkan nilai kappa sebesar 1 dan persentase agreement yang sangat tinggi yaitu sebesar 100%. Demikian halnya dengan penilaian intensitas lesi kiri dibandingkan dengan lesi kanan, semuanya menunjukkan angka kappa yang paling tinggi yaitu sebesar 1.00 artinya tingkat kesepakatan dua *observer* sangat *realible/* konsisten.

ANALISIS KORELASI ANTAR

1. Hubungan antara total score LGR6 Lesi KSB dengan LRIG1 Lapisan Basal
2. Hubungan antara total score LRIG1 Lesi KSB dengan LGR6 Lapisan Basal

Tabel 21: Tes korelasi Spearman untuk sel basal normal dan sel KSB dengan

IHK LGR6 dan LRIG1				
Variabels	Mean $\pm$ SD	Min/Max	R	P value
LGR6 Lesi KSB	5.7 $\pm$ 1.42	0/7	0.1288	0.0105
LGR6 Basal	4.41 $\pm$ 1.71	0/7		
LRiG1 Lesi KSB	5.13 $\pm$ 1.89	0/7	0.2099	0.0000
LRiG1 Basal	4.41 $\pm$ 1.71	0/7		

Hasil uji korelasi di atas menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara LGR6 dan LRIG1, antara Lesi KSB dengan dengan Nilai P value 0.0105 dan R korelasi 0.1288 (LGR6), dan nilai P value 0.0000 dan R korelasi 0.2099 (LRIG1)

Korelasi Total Scor	r	P value
LGR6 Lesi KSB vs LRIG1 Basal Upik	0.0517	0.3061
LRiG1 Lesi KSB vs LGR6 Basal Upik	-	0.3687
LGR6 Lesi KSB vs LRiG1 Basal Husni	0.2281	0.0000
LRiG1 Lesi KSB vs LGR6 Basal Husni	0.0020	0.9670

Sebelum dilakukan analisis multivariate, terlebih dahulu dilakukan analisis bivariate:

Hubungan antara Total Score LGR6 Lesi KSB dengan kategori kasus/normal

tabulate normal total_u_cat, row chi2

normal sel	frequency				row percentage		total_u_cat	
	0	1	2	3			Total	
Control	0	23	0	0			23	
	0.00	100.00	0.00	0.00			100.00	
Cases	4	0	101	289			394	
	1.02	0.00	25.63	73.35			100.00	
Total	4	23	101	289			417	
	0.96	5.52	24.22	69.30			100.00	

Pearson chi2(3) = 417.0000 Pr = 0.00

logistic normal total_u_cat

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(1) = 114.07

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -31.961778

Pseudo R2 = 0.6409

normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
total_u_cat	53.9156	33.26578	6.46	0.000	16.08886	180.6773

Hasil analisis bivariate di atas, menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara Total Score LGR6 Lesi KSB dengan Kategori kasus/normal, dengan nilai P value 0.000 dan Odd Ratio sebesar 53.91.

Hubungan antara Total Score 2 LRIG1 Lesi KSB dengan kategori kasus/normal

tabulate normal total2_u_cat, row chi2

normal sel	frequency				row percentage		total2_u_cat	
	0	1	2	3			Total	
Control	3	20	0	0			23	
	13.04	86.96	0.00	0.00			100.00	
Cases	26	2	177	189			394	
	6.60	0.51	44.92	47.97			100.00	
Total	29	22	177	189			417	
	6.95	5.28	42.45	45.32			100.00	

Pearson chi2(3) = 330.5000 Pr = 0.000

logistic normal total2_u_cat

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(1) = 49.40

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -64.299062

Pseudo R2 = 0.2775

normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
+-----+						
total2_u_cat	4.48311	1.032709	6.51	0.000	2.854305	7.041389

Hasil analisis Total Score 2 LRG1 Lesi KSB mempunyai perbedaan yang bermakna dengan Kategori kasus/normal dengan Nilai P value 0.000 dan Odd Ratio sebesar 4.48.

Analisis Multivariate dengan Analisa Logistic Regression

Ketiga variable Intensitas Warna LGR6 KSB, Total Score LGR6 KSB, dan Total Score LRG1 Lesi KSB dimasukkan dalam model analisa multivariate

. logistic normal iw1_u_cat2 total_u_cat total2_u_cat

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(3) = 143.67

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -17.161202

Pseudo R2 = 0.8072

normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
+						
iw1_u_cat2	1.431789	1.481551	0.35	0.729	.1884054	10.88089
total_u_cat	74.83077	94.14218	3.43	0.001	6.356398	880.9463
total2_u_cat	26.00901	28.57827	2.97	0.003	3.018824	224.0836

Analisis multivariate di atas menunjukkan bahwa variable intensitas warna LGR6 KSB belum menunjukkan nilai P value sebesar 0.729, artinya belum ada hubungan yang bermakna dengan kejadian kasus/kontrol.

Dengan mempertimbangkan variable total score LGR6 KSB yang kolineariy (punya hubungan kuat) dengan intensitas warna LGR6 KSB maka dipilih variable Intensitas Warna LGR6 KSB dan Total Score LRG1 Lesi KSB dalam model.

. logistic normal iw1_u_cat2 total2_u_cat

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(2) = 85.98

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -46.006266

Pseudo R2 = 0.4831

	normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
iw1_u_cat2		38.82885	28.58737	4.97	0.000	9.172034 164.3779
total2_u_cat		8.582786	3.023042	6.10	0.000	4.30345 17.11748

Kemudian 2 variabel ini dijadikan sebagai model dalam memprediksi terjadinya kasus atau kontrol, dan dianalisa dengan Logit

```
. logit normal iw1_u_cat2 total2_u_cat
Iteration 0: log likelihood = -88.998329
Iteration 1: log likelihood = -86.983447
Iteration 2: log likelihood = -54.817928
Iteration 3: log likelihood = -46.82289
Iteration 4: log likelihood = -46.038086
Iteration 5: log likelihood = -46.006367
Iteration 6: log likelihood = -46.006266
```

```
Logistic regression               Number of obs =    417
                                LR chi2(2)   =    85.98
                                Prob > chi2   =    0.0000
Log likelihood = -46.006266      Pseudo R2   =    0.4831
```

	normal	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
iw1_u_cat2		3.659164	.7362403	4.97	0.000	2.216159 5.102168
total2_u_cat		2.149759	.3522215	6.10	0.000	1.459417 2.8401
_cons		-2.623064	.7135749	-3.68	0.000	-4.021645 -1.224483

Persamaan regresi didapatkan lah persamaan sebagai berikut:

$$\text{Logit } Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$$

Sell Kasus/Kontrol = -2.62 + 3.65*intensitas warna LGR6 KSB + 2.15*Total Score LRG1 Lesi KSB

Nilai Variabel Prediktor: 0 untuk negative; dan 1 untuk positif

Akan tetapi untuk menentukan nilai Probabilitas Sell Kasus/Kontrol, perlu diubah dalam rumus:

$$\text{Probabilitas/Risk} = \frac{1}{(1 + e^{-(\text{logit})})}$$

Probabilitas/Risk Sell Kasus/Kontrol

$$= \frac{1}{1 + e^{-2.62 + 3.65 * \text{intensitas warna LGR6 KSB} + 2.15 * \text{Total Score LRIG1 Lesi KSB}}}$$

Dengan persamaan di atas didapatkanlah model untuk memprediksi probabilitas atau risiko Sell Kategori kasus/normal dengan melihat dari pengaruh nilai intensitas warna LGR6 KSB dan Total Score LRIG1 Lesi KSB.

Analisis dengan Model Skoring

Nilai Z yang paling kecil dalam model multivariate adalah intensitas warna LGR6 KSB yaitu 4.97. Semua nilai Wald variabel kemudian dibagi dengan 4.97 dan dikalikan 10, agar decimal skoring tidak terlalu banyak dan pembulatannya lebih akurat.

1. Total Score LRIG1 Lesi KSB : $6.10 / 4.97 * 10 = 12$

Kemudian dibuatlah variabel baru dari masing-masing model multivariate yang dikalikan dengan skor yang telah dihasilkan. Contohnya Total Score LRIG1 Lesi KSB kategori baru yang dikalikan dengan nilai score yang baru, begitu juga dengan semua variabel lainnya.

```
. disp 6.10/4.97
1.2273642
```

```
. gen iw1_u_cat2_score=iw1_u_cat2*10
```

```
. gen total2_u_cat_score=total2_u_cat2*12.27
total2_u_cat2 not found
r(111);
```

```
. gen total2_u_cat_score=total2_u_cat*12.27
```

```
. gen total_score1= iw1_u_cat2_score+ total2_u_cat_score
```

```
. summ total_score1
```

Variable	Obs	Mean	Std. Dev.	Min	Max
total_score1	417	35.25326	10.59048	0	46.81

```
. logistic normal total_score1 total_score1
```

note: total_score1 dropped because of collinearity

```
Logistic regression
Number of obs = 417
LR chi2(1) = 74.08
Prob > chi2 = 0.0000
Pseudo R2 = 0.4162
Log likelihood = -51.95799
```

	normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
+						
total_score1		1.174822	.0280155	6.76	0.000	1.121176 1.231035

. roctab normal total_score1, graph detail

Detailed report of Sensitivity and Specificity

Cutpoint	Sensitivity	Correctly Specificity	Classified	LR+	LR-
(>= 0)	100.00%	0.00%	94.48%	1.0000	
(>= 10)	100.00%	13.04%	95.20%	1.1500	0.0000
(>= 12.27)	93.40%	13.04%	88.97%	1.0741	0.5059
(>= 22.27)	93.15%	65.22%	91.61%	2.6780	0.1051
(>= 24.54)	92.89%	100.00%	93.29%		0.0711
(>= 34.54)	88.58%	100.00%	89.21%		0.1142
(>= 36.81)	47.97%	100.00%	50.84%		0.5203
(>= 46.81)	29.95%	100.00%	33.81%		0.7005
(> 46.81)	0.00%	100.00%	5.52%		1.0000

ROC		-Asymptotic Normal-		
Obs	Area	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	
417	0.9406	0.0120	0.91706	0.96421

. logistic normal total_score1

Logistic regression Number of obs = 417
 LR chi2(1) = 74.08
 Prob > chi2 = 0.0000
 Log likelihood = -51.95799 Pseudo R2 = 0.4162

	normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
+						
total_score1		1.174822	.0280155	6.76	0.000	1.121176 1.231035

. roctab normal total_score1, graph detail

Detailed report of Sensitivity and Specificity

Cutpoint	Sensitivity	Specificity	Correctly Classified	LR+	LR-
(>= 0)	100.00%	0.00%	94.48%	1.0000	
(>= 10)	100.00%	13.04%	95.20%	1.1500	0.0000
(>= 12.27)	93.40%	13.04%	88.97%	1.0741	0.5059
(>= 22.27)	93.15%	65.22%	91.61%	2.6780	0.1051
(>= 24.54)	92.89%	100.00%	93.29%		0.0711
(>= 34.54)	88.58%	100.00%	89.21%		0.1142
(>= 36.81)	47.97%	100.00%	50.84%		0.5203
(>= 46.81)	29.95%	100.00%	33.81%		0.7005
(> 46.81)	0.00%	100.00%	5.52%		1.0000

ROC		-Asymptotic Normal--		
Obs	Area	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	

417 0.9406 0.0120 0.91706 0.96421

Nilai Roctab dari model penjumlahan skor ini yaitu sebesar 0.9406, artinya model yang dalam analisa multivariate ini hanya bisa menggunakan 94% variabel-variabel yang berhubungan untuk memprediksi sell kasus/normal.

Dengan cut off 22.27, didapatkan nilai sen=93.15%; spe=65.22%; LR+=2.6780; LR-=0.1051

Nilai LR+ sebesar 2.6780 kalau dijadikan risk=72.8%

Risk LR+=72.8 artinya dengan uji tersebut proporsi sample positif menjadi kasus dengan hasil test positif 0.72 kali lebih besar dibandingkan dengan proporsi sell normal dengan hasil test positif.

.. cc normal total_score1

		total_score1		Proportion	
		Exposed	Unexposed	Total	Exposed
Cases	394	0	394	1.0000	
Controls	20	3	23	0.8696	
Total	414	3	417	0.9928	
		Point estimate		[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	.	.	14.65645	.	(Cornfield)
Attr. frac. ex.	.	.	.9317707	.	(Cornfield)
Attr. frac. pop	.	.			

chi2(1) = 51.76 Pr>chi2 = 0.0000

Note: exact confidence levels not possible with zero count cells

. cci 393 1 20 3

		Proportion			
	Exposed	Unexposed	Total	Exposed	
Cases	393	1	394	0.9975	
Controls	20	3	23	0.8696	
Total	413	4	417	0.9904	
		Point estimate	[95% Conf. Interval]		
Odds ratio		58.95	4.356574	3100.841	(exact)
Attr. frac. ex.		.9830365	.7704618	.9996775	(exact)
Attr. frac. pop		.9805415			
chi2(1) = 37.42 Pr>chi2 = 0.0000					

Kesimpulan Analisis Risiko dengan Skoring

1. Total score LGR6 KSB : 10
2. Total Score LRIG1 Lesi KSB : 12.27

Jika total variabel 22.27 dan di bawah 22.27 artinya sell normal, tetapi kalau di atas 22.27 artinya punya risiko menjadi sel kasus.

Analisa Multivariate dengan Analisa Logistic Regression

Ketiga variable Intensitas Warna LGR6 KSB, Total Score LGR6 KSB, dan Total Score LRIG1 Lesi KSB dimasukkan dalam model analisa multivariate. Dengan mempertimbangkan Total score LGR6 KSB yang merupakan variable yang kolineariy (punya hubungan kuat) dengan Total Score LGR6 KSB maka dipilih variable Total Score LGR6 KSB dan Total Score LRIG1 Lesi KSB dalam model, dan variabel intensitas warna dikeluarkan dari model multivariate

. logistic normal tot1_u tot2_u

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(2) = 160.91

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -8.5457038

Pseudo R2 = 0.9040

normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
tot1_u	8.490021	5.48602	3.31	0.001	2.392685	30.12534
tot2_u	7.595578	5.898144	2.61	0.009	1.657994	34.79675

Note: 0 failures and 89 successes completely determined.

Kemudian 2 variabel ini dijadikan sebagai model dalam memprediksi terjadinya kasus atau kontrol, dan dianalisa dengan Logit

. logit normal tot1_u tot2_u

Iteration 0: log likelihood = -88.998329

Iteration 1: log likelihood = -77.448833

Iteration 2: log likelihood = -35.25119

Iteration 3: log likelihood = -17.083285

Iteration 4: log likelihood = -10.79844

Iteration 5: log likelihood = -8.7435849

Iteration 6: log likelihood = -8.5477569

Iteration 7: log likelihood = -8.5457056

Iteration 8: log likelihood = -8.5457038

Iteration 9: log likelihood = -8.5457038

Logistic regression Number of obs = 417
 LR chi2(2) = 160.91
 Prob > chi2 = 0.0000
 Log likelihood = -8.5457038 Pseudo R2 = 0.9040

normal	Coef.	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
tot1_u	2.138892	.6461727	3.31	0.001	.8724163	3.405367
tot2_u	2.027566	.7765234	2.61	0.009	.5056083	3.549524
_cons	-8.193324	2.526201	-3.24	0.001	-13.14459	-3.24206

Note: 0 failures and 89 successes completely determined.

Persamaan regresi didapatkan lah persamaan sebagai berikut:

$$\text{Logit } Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2$$

Sel Kasus/Kontrol = $-8.19 + 2.13 \cdot \text{Total Score LGR6 KSB} + 2.02 \cdot \text{Total Score LRG1 Lesi KSB}$

Nilai Variabel Prediktor: 0 untuk negatif, dan 1 untuk positif

Akan tetapi untuk menentukan nilai Probabilitas Sel Kasus/Kontrol, perlu diubah dalam rumus:

$$\text{Probabilitas/Risk} = \frac{1}{1 + e^{-(\text{logit})}}$$

Probabilitas/Risk Sell Kasus/Kontrol

$$= \frac{1}{1 + e^{(-8.19 + 2.13 \cdot \text{Total Score LGR6 KSB} + 2.02 \cdot \text{Total Score LRG1 Lesi KSB})}}$$

Dengan persamaan di atas didapatkanlah model untuk memprediksi probabilitas atau risiko Sell Kategori kasus/normal dengan melihat dari pengaruh nilai intensitas warna LGR6 KSB dan Total Score LRG1 Lesi KSB.

Analisa dengan Model Skoring

Variabel	OR	P Value	z	z terbesar/z terkecil	Skor
Total Scor LGR6 KSB	8.49	0.001	3.31	3.31/2.61*10	13
Total Scor LRIG1	7.59	0.009	2.61	2.61/2.61*10	10

Nilai Z yang paling kecil dalam model multivariate adalah total score LRIG1 KSB yaitu 2.61. Semua nilai Wald variabel kemudian dibagi dengan 2.61 dan dikalikan 10, agar nilai desimal skoring tidak terlalu banyak dan pembulatannya lebih akurat. Kemudian dibuatlah variabel baru dari masing-masing model multivariate yang dikalikan dengan skor yang telah dihasilkan. Contohnya Total Score LRIG1 Lesi KSB kategori baru yang dikalikan dengan nilai score yang baru, begitu juga dengan semua variabel lainnya. Kalau LGR6 KSB + maka risikonya = 89.97 % Kalau LRIG1 + maka risikonya = 88.35 %

```
. gen tot1_u_skor=tot1_u*13
```

```
. gen tot2_u_skor=tot2_u*10
```

```
. gen total12_skor= tot1_u_skor+ tot2_u_skor
```

```
. logistic normal total12_skor
```

Logistic regression

Number of obs = 417

LR chi2(1) = 160.16

Prob > chi2 = 0.0000

Log likelihood = -8.9187942

Pseudo R2 = 0.8998

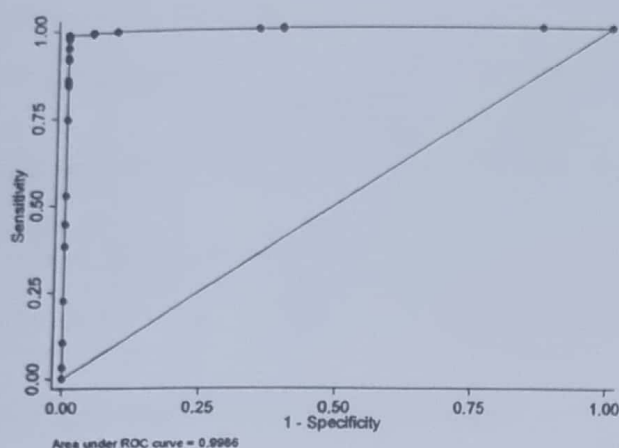
	normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
total12_skor	1	1.174926	.0565934	3.35	0.001	1.06908 1.291252

Note: 0 failures and 13 successes completely determined.

roctab normal total12_skor, graph detail
Detailed report of Sensitivity and Specificity

Cutpoint	Sensitivity	Correctly Specificity	Classified	LR+	LR-
(≥ 13)	100.00%	0.00%	94.48%	1.0000	
(≥ 23)	100.00%	13.04%	95.20%	1.1500	0.0000
(≥ 30)	100.00%	60.87%	97.84%	2.5556	0.0000
(≥ 33)	99.75%	60.87%	97.60%	2.5491	0.0042
(≥ 36)	99.75%	65.22%	97.84%	2.8677	0.0039
(≥ 40)	99.75%	91.30%	99.28%	11.4708	0.0028
(≥ 46)	99.49%	91.30%	99.04%	11.4416	0.0056
(≥ 52)	99.49%	95.65%	99.28%	22.8833	0.0053
(≥ 56)	98.98%	95.65%	98.80%	22.7665	0.0106
(≥ 60)	98.98%	100.00%	99.04%		0.0102
(≥ 65)	98.48%	100.00%	98.56%		0.0152
(≥ 78)	97.97%	100.00%	98.08%		0.0203
(≥ 91)	95.18%	100.00%	95.44%		0.0482
(≥ 102)	92.39%	100.00%	92.81%		0.0761
(≥ 108)	92.13%	100.00%	92.57%		0.0787
(≥ 115)	91.88%	100.00%	92.33%		0.0812
(≥ 118)	86.04%	100.00%	86.81%		0.1396
(≥ 122)	85.03%	100.00%	85.85%		0.1497
(≥ 125)	84.26%	100.00%	85.13%		0.1574
(≥ 128)	74.62%	100.00%	76.02%		0.2538
(≥ 135)	52.79%	100.00%	55.40%		0.4721
(≥ 138)	44.67%	100.00%	47.72%		0.5533
(≥ 141)	38.32%	100.00%	41.73%		0.6168
(≥ 148)	22.59%	100.00%	26.86%		0.7741
(≥ 151)	10.41%	100.00%	15.35%		0.8959
(≥ 161)	3.30%	100.00%	8.63%		0.9670
(> 161)	0.00%	100.00%	5.52%		1.0000

ROC		-Asymptotic Normal--		
Obs	Area	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	
417	0.9986	0.0011	0.99632	1.00000



Nilai Roctab dari model penjumlahan skor ini yaitu sebesar 0.9986, artinya model yang dalam analisis multivariate ini bisa menggunakan 99.86% variabel-variabel yang berhubungan untuk memprediksi sel kasus/normal.

Dengan cut off 56, didapatkan nilai $\text{sen}=98.98\%$; $\text{spe}=95.65\%$; $\text{LR}+=22.76$; $\text{LR-}=0.0106$

Nilai $\text{LR}+$ sebesar 22.76 kalau dijadikan $\text{risk}=(22.76/1+22.76)=95.79\%$

Risk $\text{LR}+=95.79\%$ artinya dengan uji tersebut proporsi sampel positif menjadi kasus dengan hasil test positif 0.95 kali lebih besar dibandingkan dengan proporsi sel normal dengan hasil test positif.

```
. gen total12_skor_kat = total12_skor
```

```
. recode total12_skor_kat min/55.9999=0 56/max=1  
(total12_skor_kat: 417 changes made)
```

```
. tabulate normal total12_skor_kat, row chi2
```

	frequency row percentage		total12_skor_kat
normal sel	0	1	Total
Control	22	1	23
	95.65	4.35	100.00
Cases	4	390	394
	1.02	98.98	100.00
Total	26	391	417
	6.24	93.76	100.00

Pearson $\chi^2(1) = 332.9135$ Pr = 0.000

. logistic normal total12_skor_kat

Logistic regression Number of obs = 417
 LR chi2(1) = 141.74
 Prob > chi2 = 0.0000
 Log likelihood = -18.129826 Pseudo R2 = 0.7963

	normal	Odds Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
total12_sk-t	2145	2443.812	6.73	0.000	229.9578	20008.13

Kesimpulan Analisa Risiko dengan Skoring

1. Total Score LGR6 KSB : 13
2. Total Score LRiG1 Lesi KSB : 10

Variabel	OR	P Value	z	z terbesar/z terkecil	Skor
Total Scor LGR6 KSB	8.49	0.001	3.31	3.31/2.61*10	13
Total Scor LRiG1	7.59	0.009	2.61	2.61/2.61*10	10

Jika total skor di bawah 56 artinya sel normal, tetapi kalau di atas atau sama dengan 56 artinya punya risiko menjadi sel kasus.

Uji Korelasi Spearman antara LGR6 Lesi KSB dengan LGR6 Basal dan Hubungan LRiG1 Lesi KSB dengan LRiG1 Basal

Tabel Uji Korelasi Spearman Sel normal/Basal dengan Sel Lesi KSB

Variabel	Mean±SD	Min/Max	r	P value
LGR6 Lesi KSB	5.7±1.42	0/7	0.1288	0.0105
LGR6 Basal	4.41±1.71	0/7		
LRiG1 Lesi KSB	5.13±1.89	0/7	0.2099	0.0000
LRiG1 Basal	4.41±1.71	0/7		

Hasil uji korelasi di atas menunjukkan adperbedaan yang bermakna antara LGR6 Lesi KSB dengan LGR6 Basal dengan Nilai P value 0.0105 dan R korelasi 0.1288. Sedangkan hubungan antara LRiG1 Lesi KSB dengan LRiG1 Basal mempunyai korelasi yang bermakna dengan nilai P value 0.0000 dan R korelasi 0.2099.

Output Statistik STATA:

```
. summ tot1_u tot2_u tot3_u tot4_u
      Variable |      Obs      Mean    Std. Dev.      Min      Max
-----+-----+-----+-----+-----+-----
      tot1_u |      417    5.702638    1.423639         0         7
      tot2_u |      417    5.131894    1.899991         0         7
      tot3_u |      394    4.411168    1.710163         0         7
      tot4_u |      394    5.07868     .5894771         0         6
```

```
. spearman tot1_u tot4_u
      Number of obs =      394
      Spearman's rho =      0.1288
```

```
Test of Ho: tot1_u and tot4_u are independent
      Prob > |t| =      0.0105
```

```
. spearman tot2_u tot3_u
      Number of obs =      394
      Spearman's rho =      0.2099
```

```
Test of Ho: tot2_u and tot3_u are independent
      Prob > |t| =      0.0000
```

Jawaban Perhitungan Sampel dan Analisa Hubungan Basal dengan Lesi KSB (Rev Veli 17 Oktober 2012)

- 1 : LGR6 Lesi KSB
- 2 : LRiG1 Lesi KSB
- 3 : LRiG1 Basal
- 4 : LGR6 Basal

Curriculum vitae

Nama : Sukmawati Tansil Tan
Tempat/tgl lahir : Bagansiapi-api, 14 juli 1964
Alamat : Jln Raya Serpong, Union Square, 9-11
Gading Serpong – Tangerang – Indonesia
Telefon/email 0811174535, email : sukmawati_tsl@yahoo.com

Riwayat pendidikan/pekerjaan

1. SD Methodist Bagansiapi-api 1976
2. SMP Methodist Bagansiapi-api 1976-1979
3. SMA Methodist – Hang Tuah – Medan 1979-1982
4. FK-UKI Cawang – Jakarta Indonesia 1989
5. Asisten Patologi Anatomi FK-UKI 1989-1990
6. Kepala Puskesmas Sulamadaha-Ternate-Maluku Utara 1990-1994
7. Wakil kepala Puskesmas Tambak Aji – Semarang – Jawa tengah 1994-1995
8. FK UNDIP – Semarang juni 1995-mei 1999
9. Stiefel Fellowship National Skin Centre – Singapur Juni-Agustus 1999
10. Short Course Dermatosurgery and laser- National Skin Centre – Singapur, januari-maret 2000
11. Kepala bagian kulit dan kelamin, RSU-Adjidarmo – Rangkas Bitung, Banten-Tangerang : maret 2000 sampai oktober 2009

12. dokter spesialis : RS Siloam karawaci 2000-2007

13. dokter spesialis : RS Mayapada _Tangerang 2000- sekarang

PELATIHAN/SIMPOSIUM

1. 1992, Air susu Ibu di Tinjau dari Beberapa aspek, Ternate
2. 1992, Dermato Alergi Maluku, Ternate
3. 1992, Aspek Seksual dalam Keluarga, Ternate
4. 1993, Konggres Nasional IX Persatuan Ahli Penyakit Dalam, Denpasar, Bali
5. 1994, Konperensi Kerja Nasional Perhimpunan Peneliti Hati Indonesia (PPHI) VI Perkumpulan Endoskopi Gastrointestinal Indonesia (PEGI) Perhimpunan Gastroenterologi Indonesia (PGI) V
6. 1994, Piagam, Semarang
7. 1994, Panitia Simposium Pengobatan TBC Paru dan Pemeriksaan Immunologik sebagai Penunjang Diagnosis bagian Penyakit dalam Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS DR. Kariadi Semarang, Semarang
8. 1994, "Community Acquired Infectionis: Current problems and Management", Semarang
9. 1994, Panitia Simposium Pengelolaan Mukthahir Osteoarthritis Ikatan Rematologi Indonesia cabang Semarang, Semarang
10. 1994, Meningkatkan Efisiensi dan Efektifitas Sumberdaya Puskesmas dalam Pelayanan, Semarang
11. 1995, Seminar Infertilitas VII, Semarang
12. 1995, Peranan dan Mamfaat Olah Raga pada Diabetes Mellitus, Semarang
13. 1995, Simposium Obesitas Penyakit Penyerta dan Penatalaksanaan, Semarang
14. 1995, Simposium Geriatri, Semarang
15. 1995, Pendekatan pada Terapi Gagal Jantung, Semarang
16. 1995, Penatalaksanaan Infeksi Saluran Nafas, RSUP Dr. Kariadi Semarang
17. 1996, Steroid Alergi, Maluku
18. 1996, Diagnosis dan Penatalaksanaan Dermatofisosis Masa Kini, Jakarta
19. 1997, Simposium Endothelial and Coronary Artery Disease, Semarang
20. 1997, Panitia Simposium Perkembangan Mutakhir dalam Penatalaksanaan Hepatitis Kronis, Semarang
21. 1997, Penatalaksanaan Mikosis Superfisialis, Semarang
22. 1997, Simposium Sehari Penanganan Gangguan Saluran Napas dalam Praktek Sehari-Hari, Semarang
23. 1997, Penyakit Hati dan Pengobatannya, Semarang

24. 1997, The Organizing Community, Bali
25. 1997, Kebugan Sex dan Penyakit Menular, Bandung
26. 1997, Penyegaran III Pencegahan dan Deteksi Dini Kanker, Jakarta
27. 1997, Dermatologi Akibat Kerja di Indonesia, Jakarta
28. 1998, 4th National Congress of the Indonesian Society for the Study of Tropical Medicine and Infections Diseases and 3th Join Meeting of the Indonesian Society for the Study of Tropical Medicine and Infections Diseases with Infections Diseases of the Netherlands and Flanders, Semarang
29. 1998, Simposium Era Baru Pengobatan Penyakit Infeksi Saluran Nafas Dengan "Quinolone", Semarang
30. 1998, Patogen Atipikal : Peranan dan Penatalaksanaan pada Infeksi Saluran Napas, Semarang
31. 1998, Simposium Nasional Rematik Pengenalan dan Pengelolaan Artropati Seronegatif, Semarang
32. 1999, Penanganan Penyakit Arteri Oklusif dan Stroke Kini dan Masa Depan, Semarang
33. 1999, Atypical Pathogens In Respiratory, Semarang
34. 1999, Pengenalan dan Pencegahan Penyakit pada Usia Lanjut agar tetap Sehat dan Bernalitas, Semarang
35. 1999, Konggres Nasional IX, Surabaya
36. 2000, "CT Scan sebagai Penunjang Diagnostik Kasus Cedera Kepala dan Stroke", Tangerang
37. 2000, Certificate of Medical Registration, Singapore
38. 2000, The Thirty-six Hour Course in Pre Intermediate Level (3), Universitas Katolik Soegijapranata
39. 2000, Piagam Peserta, Jakarta
40. 2000, Certificate Of Attendance Stiefel Laboratories National Skin center, Jakarta
41. 2000, Pertemuan Ilmiah Tahunan V, Semarang
42. 2000, National Skin Center, Jakarta
43. 2000, Laser and Cosmetic, Singapore
44. 2001, Dermatology, Bangkok
45. 2002, Kesehatan dan Keindahan Rambut, Jakarta
46. 2003, Simposium Peremajaan Kulit, Jakarta
47. 2005, Anti Aging, Jakarta
48. 2005, RS Honoris & Pigeon, Tangerang
49. 2005, With DR Spiller, Jakarta
50. 2005, Penyakit Papuloneritroskuomosa dan Dermatormicosis Superfisialis pada Bayi dan Anak, Semarang
51. 2005, Handson Training on Feather life Aptos Threed, Jakarta
52. 2006, Skin Sunary, Bali

53. 2006, Creative Eyebrows, Jakarta
54. 2006, Dermatology UpDate, Singapore
55. 2006, Anti Aging Medicine, Jakarta
56. 2006, Regional Dermatologi, Bali
57. 2006, Penyegaran Cardio Resulation, Lippokarawaci Tangerang
58. 2007, Bakti Soaial Perdoski Peduli Skabies di Pesantren Al Khairiyah Cilegon, Cilegon
59. 2007, Plenary Lecture, Surabaya
60. 2007, Pelatihan Sedot Lemak, Bandung
61. 2007, Base Learning, UPH Tangerang
62. 2007, Symposium Skine, Bandung
63. 2007, Pelatihan Hands Botox, Jakarta
64. 2007, Dermatological Society of Singapore, Singapore
65. 2007, Pertemuan Ilmiah Tahunan IX Perdoski Simposium Bleaching, Jakarta
66. 2007, Symposium on the Role of Ubiquinoa Homocysteine in same diseases, Jakarta
67. 2007, Klinik Kulit dan Kecantikan, Jakarta
68. 2007, The Westin Excelstor Venice Lipo, Italy
69. 2008, Insulin Analogue : New Tools Againts Challenges in Diabetes, Jakarta
70. 2008, Siang Klinik Perdoski, Banten
71. 2008, Body Contouring Surgical, Bandung
72. 2008, National Symposium on Aesthetic Medicine, Bali
73. 2008, Sosialis P-2KB Pengembangan Pendidikan, Jakarta
74. 2008, Meningkatkan Profesionalisme dan Kompetisi DR Spesialis Kulit dan Kelamin, Palembang
75. 2008, Aspek Kosmetik dan Kelainan Kulit, Ternate
76. 2008, Majalah Alergi dan Imunologi, RSU Serang
77. 2008, Penyakit Papuloeritroskuomosa dan Dermatologi pada Bayi dan Anak
78. 2008, Skin and Soft Tissue, Banten
79. 2008, Dermatologi Veneral, Jakarta
80. 2009, Siang Klinik Perdoski, Banten
81. 2009, Obesity Mision Possible, Jakarta
82. 2009, Participation Anti Aging Regenerative Medicine, Jakarta
83. 2009, Skin Pigmentation, Jakarta
84. 2012, 11th Congress of European Society for Pediatric Dermatology, Istambul Turkey