

The background of the cover features a grayscale image of a microscope on the left and a microscopic view of cells with blue and brown staining on the right. In the lower-left foreground, there is a 3D illustration of two orange, cylindrical cells with internal organelles, connected by a blue junction. Yellow, branching structures resembling dendrites or neurons extend from the top and bottom of these cells.

ANALISIS IMUNOHISTOKIMIA UNTUK PENDETEKSIAN BIOMARKER PROTEIN DALAM BIDANG KEDOKTERAN GIGI

Ferry Sandra
Pretty Trisfilha
Jessica Endriyana
Alfred Pakpahan
Priska Natassya

Editor:
Afrinda Dwi Wahyuni



The Prodia Education and Research Institute

ANALISIS IMUNOHISTOKIMIA UNTUK PENDETEKSIAN BIOMARKER PROTEIN

Dalam Bidang Kedokteran Gigi

Ferry Sandra

Pretty Trisfilha

Jessica Endriyana

Alfred Pakpahan

Priska Natassya

Editor:

Afrinda Dwi Wahyuni



Analisis Imunohistokimia untuk Pendeteksian Biomarker
Protein Dalam Bidang Kedokteran Gigi

Ditulis oleh:

**Ferry Sandra, Pretty Trisfilha, Jessica Endriyana, Alfred Pakpahan,
Priska Natassya**

Diterbitkan oleh:

The Prodia Education and Research Institute

Prodia Tower, Lt 9

Jl. Kramat Raya No.150, Jakarta Pusat

<https://prodia.institute/>



Anggota Ikatan Penerbit Indonesia (IKAPI)

No. 661/DKI/2025



Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang mengutip atau memperbanyak baik sebagian atau keseluruhan isi buku dengan cara apapun tanpa izin tertulis dari penerbit.

Cetakan I, September 2026

Editor:

Afrinda Dwi Wahyuni

Perancang Sampul: Ferry Sandra

Penata Letak: Afrinda Dwi Wahyuni

ISBN: 978-634-05-7093-9

Halaman: viii + 223 hlm. ; 15,5x23 cm

Prakata

Imunohistokimia merupakan teknik yang sangat penting dalam bidang biologi molekuler serta patologi anatomi, khususnya untuk analisis protein. Namun, meskipun sering digunakan dalam berbagai penelitian dan pemeriksaan pendukung klinik, teknik Imunohistokimia masih sulit untuk dilakukan dengan baik terutama pada para mahasiswa yang baru mengenal teknik ini. Oleh karena itu, buku ajar ini disusun untuk memberikan pemahaman yang komprehensif mengenai prinsip, prosedur, dan aplikasi dari teknik Imunohistokimia. Buku ini diharapkan dapat menjadi referensi yang memadai untuk membantu mahasiswa memahami langkah-langkah teknis dan tantangan yang ada dalam penerapan teknik ini. Kelebihan buku ajar ini adalah penjelasan yang disusun secara sistematis dan mudah dipahami oleh mahasiswa, dilengkapi dengan ilustrasi yang mempermudah pemahaman setiap langkah dalam proses imunohistokimia. Buku ini juga menyajikan analisis data yang relevan dengan eksperimen laboratorium sehari-hari, serta memberikan tips dan trik untuk mengatasi masalah yang sering terjadi dalam aplikasi teknik ini.

Buku ini ditulis untuk masyarakat secara umum, para dosen dan mahasiswa Kedokteran Gigi di Indonesia yang memiliki ketertarikan dalam analisis biologi molekuler dan patologi anatomi dengan teknik Imunohistokimia. Buku ini diharapkan dapat turut menyebarkan keilmuan dan teknik analisis dengan metode imunohistokimia, sehingga menjadi pengetahuan yang banyak diketahui mengingat ilmu dan pengetahuan mengenai analisis biologi molekuler dan patologi anatomi yang menjadi

pengetahuan fundamental di bidang kedokteran gigi. Buku ini juga diharapkan dapat memicu ketertarikan penelitian dalam bidang biologi molekuler dan patologi anatomi dengan menggunakan teknik imunohistokimia serta dapat menjadi tambahan referensi bagi peneliti.

Agar dapat menggunakan buku ajar ini dengan efektif, mahasiswa disarankan untuk memiliki dasar pengetahuan tentang biokimia, biologi molekuler, histologi, patologi dan imunologi. Mahasiswa diharapkan aktif dalam praktikum dan eksperimen di laboratorium serta workshop untuk memperoleh pengalaman langsung dalam mengaplikasikan teori yang dipelajari seperti pembuatan sediaan jaringan, fiksasi jaringan, serta teknik pewarnaan dan interpretasi hasil dari analisis yang dilakukan.

Buku ajar ini dibagi menjadi beberapa bagian yang memudahkan mahasiswa dalam mempelajari teknik IHK secara bertahap. Bagian pertama membahas prinsip dan teknik IHK yang didalamnya membahas dasar molekuler dan protocol dasar dalam imunohistokimia. Kemudian pada bab 2 membahas terkait marker imunohistokimia yang dibahas per bab dari marker epitelial, proliferasi, angiogenesis dan imunomodulator. Pada bab terakhir yakni bab 3 membahas terkait aplikasi klinis IHK dan peran dokter gigi dalam diagnosis dan manajemen.

Buku ajar ini diharapkan dapat menjadi panduan yang efektif dalam mengajarkan teknik Imunohistokimia kepada mahasiswa. Dosen dapat menggunakan buku ini sebagai referensi utama dalam menyampaikan materi yang berkaitan dengan analisis protein, serta sebagai bahan pendukung dalam praktikum. Buku ini juga dilengkapi dengan contoh praktis yang dapat dijadikan bahan diskusi di kelas, sehingga diharapkan proses pembelajaran akan lebih interaktif dan aplikatif.

Untuk memperdalam pemahaman terhadap materi dalam buku ini, pembaca disarankan untuk mempelajari literatur pendukung yang berkaitan dengan teori dan aplikasi klinis imunohistokimia. Pengetahuan dasar mengenai biokimia, biologi molekuler, histologi, patologi, dan imunologi juga perlu dipahami sebagai landasan dalam mempelajari materi yang disajikan. Salah satu referensi pendukung yang dapat digunakan adalah buku Teknik Dasar Histokimia dan IHK, sepanjang relevan dengan topik yang dipelajari. Pembaca juga dapat mengikuti pelatihan atau lokakarya mengenai teknik dan aplikasi imunohistokimia untuk memperluas pemahaman teoretis dan praktis.

Jakarta, 18 Februari 2025

Penulis

Daftar Isi

iii **Prakata**

vi **Daftar Isi**

viii **Daftar Gambar**

BAB I

- 1 Dasar Molekuler Reaksi Imun: Antigen, Antibodi, dan Afinitas
- 22 Protokol IHK: Langkah Teknis dan Variabel Proses
- 44 Teknik Lanjutan: Multiplex IHK dan Imunofluoresens
- 55 *Troubleshooting*, Reprodusibilitas, dan Dokumentasi
Laboratorium

BAB II

- 67 *Marker* Epitelial dan Diferensiasi
- 87 *Marker* Proliferasi, Siklus Sel, dan Apoptosis
- 102 *Marker* Angiogenesis, Invasivitas, dan Metastasis
- 126 *Marker* Imun dan Imunomodulator dalam *Microenvironment*
Tumor

BAB III

162	Dari Hasil IHK ke Rencana Perawatan: Prinsip Kolaborasi
177	Peran Dokter Gigi dalam Skrining dan Deteksi Dini
185	Keterbatasan Diagnostik IHK di Praktik Klinik Gigi
197	Perspektif Masa Depan Penggunaan IHK dan Biomarker dalam Praktik Klinik Gigi

202 Daftar Singkatan

205 Glosarium

211 Indeks

215 Daftar Pustaka

219 Profil Penulis

225 Profil Editor

Daftar Gambar

Gambar 1. Interaksi Antigen dan Antibodi dalam Teknik IHK.....	3
Gambar 2. Mekanisme Ikatan Antigen–Antibodi.....	11
Gambar 3. Persiapan slide dan proses dewaxing/rehidrasi pada pemeriksaan IHK.....	25
Gambar 4. Metode <i>antigen retrieval</i> pada IHK.....	28
Gambar 5. Blokade non-spesifik pada IHK.....	31
Gambar 6. Citra imunofluoresens sel.....	47
Gambar 7. Skema epitel skuamosa berlapis.....	69
Gambar 8. Skema hierarki diferensiasi sel tumor epitel skuamosa dan peran marker p63/p40 serta <i>marker stemness</i>	72
Gambar 9. Skema diferensiasi epitel skuamosa dan perubahan ekspresi <i>marker</i> keratinisasi.....	74
Gambar 10. Susunan <i>junction</i> antar sel.....	78
Gambar 11. Skema regulasi apoptosis	95
Gambar 12. Regulasi CTLA-4 dalam Aktivasi Sel T.....	143

BAB I

Prinsip dan Teknik Imunohistokimia (IHK) untuk Deteksi Tumor

TUJUAN PEMBELAJARAN :

Mahasiswa memahami prinsip dasar teknik IHK dalam aplikasinya untuk deteksi tumor, sehingga mampu menguasai konsep teoretis secara mendalam dalam bidang ilmu biomedis, khususnya terkait mekanisme pensinyalan dan deteksi molekuler yang bermanfaat dalam diagnosis penyakit infeksi maupun non-infeksi.

CAPAIAN PEMBELAJARAN:

Mahasiswa mampu memahami prinsip dasar serta berbagai aplikasi IHK, sehingga dapat menjelaskan manfaat dan penerapan teknik ini dalam mendeteksi *biomarker* secara molekuler untuk menunjang diagnosis penyakit infeksi dan non-infeksi.

A. Dasar Molekuler Reaksi Imun: Antigen, Antibodi, dan Afinitas

Imunohistokimia (IHK) didasarkan pada prinsip reaksi imun antara antigen dan antibodi yang berlangsung secara spesifik. Interaksi tersebut memungkinkan lokalisasi protein target pada tingkat seluler dan jaringan, tetapi keberhasilan deteksi sangat dipengaruhi oleh karakteristik antigen, antibodi, fiksasi, dan sistem visualisasi (Ramos-Vara, 2014). Reaksi ini memungkinkan identifikasi dan lokalisasi protein tertentu di dalam

jaringan. Pemahaman mengenai sifat molekuler antigen, struktur antibodi, serta konsep afinitas sangat penting untuk menjelaskan bagaimana sinyal pewarnaan dapat terbentuk dan diinterpretasikan dalam pemeriksaan IHK.

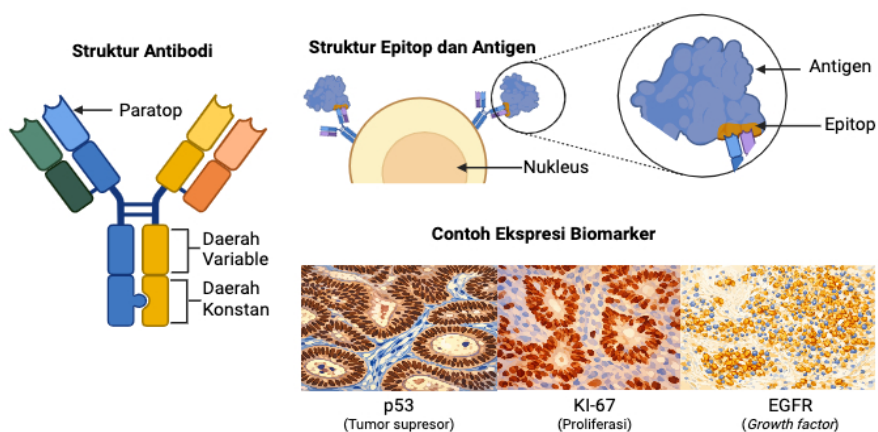
Antigen adalah molekul, umumnya berupa protein atau glikoprotein, yang terdapat di dalam sel atau jaringan dan dapat dikenali secara spesifik oleh antibodi. Bagian antigen yang secara langsung berikatan dengan antibodi disebut epitop. Dalam jaringan biologis, antigen dapat berada di berbagai lokasi, seperti pada inti sel, sitoplasma, atau membran sel. Lokasi ini akan menentukan pola pewarnaan yang terlihat pada pemeriksaan IHK dan membantu dalam interpretasi diagnostik.

Antibodi merupakan protein imunoglobulin yang diproduksi oleh sel B dan dirancang untuk mengenali epitop tertentu pada antigen. Setiap antibodi memiliki daerah pengikat antigen yang bersifat sangat spesifik. Dalam praktik IHK, antibodi primer digunakan untuk mengikat antigen target, kemudian diikuti oleh sistem deteksi yang menghasilkan sinyal visual. Interaksi antara antigen dan antibodi bersifat non-kovalen dan melibatkan gaya elektrostatik, ikatan hidrogen, serta interaksi hidrofobik dan gaya van der Waals. Kombinasi interaksi tersebut menentukan stabilitas kompleks antigen-antibodi dan memengaruhi spesifitas sinyal IHK (Ramos-Vara, 2005).

Afinitas merujuk pada kekuatan ikatan antara satu situs pengikat antibodi dengan satu epitop antigen. Antibodi dengan afinitas tinggi akan membentuk ikatan yang lebih stabil sehingga menghasilkan pewarnaan yang lebih jelas dan spesifik. Selain afinitas, dikenal pula konsep aviditas, yaitu kekuatan total interaksi antara antibodi dan antigen yang memiliki banyak situs ikatan. Afinitas dan aviditas yang

baik sangat berperan dalam meningkatkan sensitivitas dan mengurangi pewarnaan non-spesifik pada IHK. Dalam konteks kedokteran gigi, pemahaman mengenai dasar molekuler reaksi imun ini penting untuk menjelaskan variasi ekspresi *biomarker* protein pada jaringan normal, lesi pra-kanker, dan tumor ganas. Interaksi antigen–antibodi yang optimal memungkinkan deteksi *biomarker* secara akurat, yang selanjutnya mendukung penegakan diagnosis dan penilaian karakter biologis lesi.

Antibodi memiliki struktur berbentuk huruf Y yang terdiri atas daerah variabel dan daerah konstan. Daerah variabel mengandung paratop yang berfungsi mengenali dan berikatan secara spesifik dengan epitop pada antigen target. Pada jaringan, antigen terlokalisasi di kompartemen sel tertentu (nuklear, sitoplasmik, atau membran), dan ikatan antigen–antibodi inilah yang menjadi dasar deteksi protein pada teknik IHK. Contoh *biomarker* yang sering digunakan dalam diagnosis dan evaluasi tumor rongga mulut meliputi Ki-67 sebagai penanda proliferasi sel, p53 sebagai regulator siklus sel dan supresor tumor, serta EGFR yang berperan dalam sinyal pertumbuhan dan progresi tumor.



Gambar 1. Interaksi Antigen dan Antibodi dalam Teknik IHK.

1. Sifat Antigen dan Epitop pada Jaringan *Formalin-Fixed*

Dalam praktik IHK, jaringan yang digunakan umumnya telah mengalami fiksasi menggunakan formalin. Fiksasi ini diperlukan untuk mempertahankan integritas morfologi jaringan serta mencegah proses autolisis dan degradasi. Namun, di sisi lain, formalin menimbulkan perubahan molekuler pada antigen dan epitop yang dapat memengaruhi kemampuan antibodi untuk mengenali targetnya secara optimal. Oleh karena itu, pemahaman mengenai sifat antigen dan epitop pada jaringan *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded* (FFPE) menjadi dasar penting dalam interpretasi hasil IHK.

Secara kimiawi, formalin bekerja dengan membentuk ikatan silang antar protein yang dapat mengubah aksesibilitas epitop terhadap antibodi. Variasi waktu fiksasi, keterlambatan memasukkan jaringan ke dalam fiksatif, jenis fiksatif, dan kondisi pemrosesan dapat memengaruhi keberhasilan deteksi antigen pada jaringan FFPE (Shi, 2007; Engel, 2011; Leong, 2004). Proses ini menyebabkan protein terperangkap dalam matriks jaringan yang padat dan relatif kaku. Kondisi tersebut memang menguntungkan untuk mempertahankan struktur histologis, tetapi pada saat yang sama membatasi fleksibilitas molekul antigen yang diperlukan untuk pengikatan antibodi. Akibatnya, antigen pada jaringan formalin-fixed sering kali tidak berada dalam kondisi optimal untuk dikenali secara langsung.

Perubahan struktur protein akibat ikatan silang formalin berdampak pada epitop, yaitu bagian spesifik dari antigen yang berinteraksi dengan antibodi. Ikatan silang ini dapat menutupi atau menyembunyikan epitop (*epitope masking*), sehingga akses antibodi terhadap antigen dapat berkurang dan menghasilkan intensitas pewarnaan yang lebih rendah

(Shi, 2006; D'Amico, 2008). Ketika epitop tidak dapat diakses, antibodi yang diaplikasikan pada preparat jaringan tidak mampu berikatan secara efektif, sehingga menghasilkan pewarnaan yang lemah atau bahkan negatif palsu. Selain itu, tahapan lanjutan dalam pemrosesan jaringan, seperti pemanasan selama infiltrasi parafin, dapat menyebabkan denaturasi parsial protein yang mengubah konformasi alami antigen.

Berdasarkan responsnya terhadap fiksasi formalin, epitop menunjukkan karakteristik yang berbeda-beda. Beberapa epitop, khususnya epitop konformasional yang sangat bergantung pada struktur tiga dimensi protein, bersifat sensitif terhadap formalin dan mudah mengalami kerusakan atau penutupan. Sebaliknya, epitop lain yang tersusun atas urutan asam amino linear cenderung lebih stabil dan relatif tetap dapat dikenali, meskipun tingkat aksesibilitasnya tetap dapat berkurang. Perbedaan sifat ini menjelaskan mengapa suatu antibodi dapat memberikan hasil pewarnaan yang baik pada satu antigen, tetapi tidak pada antigen lain yang diproses dengan cara serupa.

Untuk mengatasi keterbatasan aksesibilitas epitop pada jaringan FFPE, dikembangkan teknik perolehan kembali antigen atau *antigen retrieval*. Teknik ini bertujuan untuk memulihkan kemampuan antibodi dalam mengenali epitop dengan memodifikasi atau menghilangkan sebagian efek cross-linking akibat fiksasi. Dua pendekatan utama yang digunakan adalah *heat-induced epitope retrieval* (HIER) dan *enzymatic retrieval* (Shi, 2006; D'Amico, 2008). Pemilihan metode perolehan kembali antigen harus disesuaikan dengan jenis antigen, antibodi, dan tujuan pemeriksaan, karena perlakuan yang tidak tepat dapat merusak struktur jaringan atau justru menghilangkan antigen target.

Secara keseluruhan, tantangan utama dalam penggunaan jaringan FFPE pada IHK terletak pada upaya menjaga keseimbangan antara preservasi morfologi jaringan dan keterjagaan sifat antigenik. Tanpa pemahaman yang memadai mengenai perubahan antigen dan epitop akibat fiksasi formalin serta penerapan teknik perolehan kembali antigen yang sesuai, hasil IHK dapat menjadi tidak representatif dan menyesatkan. Oleh sebab itu, penguasaan konsep ini merupakan landasan penting dalam penerapan IHK, khususnya dalam bidang kedokteran gigi yang menuntut ketelitian tinggi dalam evaluasi *biomarker* jaringan.

2. Mekanisme Ikatan Antigen-Antibodi dan Faktor yang Mempengaruhi Afinitas

Keberhasilan pemeriksaan IHK pada dasarnya ditentukan oleh satu peristiwa biologis yang sangat spesifik, yaitu interaksi antara antigen dan antibodi. Seluruh tahapan teknis dalam IHK mulai dari fiksasi, *antigen retrieval*, inkubasi antibodi, hingga visualisasi bertujuan untuk memastikan bahwa interaksi ini dapat terjadi secara optimal dan terdeteksi dengan jelas. Oleh karena itu, pemahaman mengenai mekanisme ikatan antigen-antibodi serta faktor-faktor yang memengaruhi kekuatan dan stabilitasnya menjadi landasan penting bagi mahasiswa kedokteran gigi dalam menafsirkan hasil IHK secara rasional.

Secara molekuler, antibodi mengenali bagian spesifik dari antigen yang disebut epitop. Epitop dapat berupa urutan linear asam amino atau struktur konformasi tiga dimensi yang terbentuk dari lipatan protein. Pada jaringan hidup, struktur ini relatif stabil. Namun, dalam praktik patologi, jaringan telah mengalami proses fiksasi dan

pemrosesan sehingga konfigurasi aslinya dapat berubah. Kondisi inilah yang menjadikan interaksi antigen–antibodi dalam IHK tidak selalu identik dengan interaksi yang terjadi dalam sistem biologis alami.

Ikatan antara antigen dan antibodi tidak bersifat kovalen permanen, melainkan terbentuk melalui gaya intermolekuler yang relatif lemah namun sangat spesifik. Interaksi tersebut meliputi ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik antara muatan positif dan negatif, interaksi hidrofobik, serta gaya van der Waals. Meskipun masing-masing gaya ini lemah, kombinasi dari berbagai interaksi secara simultan menghasilkan kestabilan yang cukup untuk mempertahankan kompleks antigen–antibodi selama proses pewarnaan. Karena bersifat non-kovalen, ikatan ini juga reversibel dan sensitif terhadap perubahan lingkungan kimia maupun fisik.

Dalam konteks ini dikenal dua istilah penting, yaitu afinitas dan aviditas. Afinitas menggambarkan kekuatan ikatan antara satu situs pengikat pada antibodi dengan satu epitop pada antigen. Sementara itu, aviditas mencerminkan kekuatan total interaksi multivalen antara antibodi dan antigen yang memiliki beberapa situs pengikatan. Dalam praktik IHK, aviditas sering kali lebih menentukan intensitas dan kestabilan pewarnaan dibandingkan afinitas tunggal, karena antibodi dan antigen biasanya memiliki lebih dari satu titik interaksi.

Kekuatan dan kestabilan ikatan antigen–antibodi sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, terutama pH. Protein merupakan molekul yang sensitif terhadap perubahan derajat keasaman karena muatan listrik pada permukaannya bergantung pada konsentrasi ion hidrogen. Perubahan pH dapat mengubah distribusi muatan

pada antigen maupun antibodi, sehingga memengaruhi interaksi elektrostatik di antara keduanya. Pada pH yang terlalu asam atau terlalu basa, struktur tiga dimensi protein dapat mengalami denaturasi, yang berujung pada hilangnya kemampuan pengenalan epitop. Oleh karena itu, sebagian besar prosedur IHK dilakukan dalam kondisi bufer dengan pH mendekati fisiologis. Menariknya, pada tahap *antigen retrieval* justru digunakan variasi pH tertentu misalnya bufer sitrat dengan pH lebih rendah atau Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) dengan pH lebih tinggi untuk membantu membuka kembali epitop yang tertutup akibat proses fiksasi. Hal ini menunjukkan bahwa pH tidak hanya memengaruhi ikatan imunologis secara langsung, tetapi juga memengaruhi aksesibilitas antigen terhadap antibodi.

Selain pH, suhu merupakan faktor penting lain yang memengaruhi kinetika reaksi imunologis. Peningkatan suhu umumnya mempercepat pergerakan molekul sehingga meningkatkan peluang terjadinya tumbukan efektif antara antigen dan antibodi. Namun, suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, baik pada antigen maupun antibodi, sehingga justru menurunkan spesifisitas ikatan. Dalam praktik laboratorium, inkubasi antibodi dapat dilakukan pada suhu ruang atau pada suhu lebih rendah untuk meningkatkan spesifisitas dan mengurangi ikatan non-spesifik. Pada tahap *antigen retrieval*, pemanasan terkendali digunakan untuk membantu memutus sebagian ikatan silang akibat fiksasi formalin. Dengan demikian, suhu memiliki peran ganda: mempercepat reaksi sekaligus berpotensi merusak struktur jika tidak dikontrol secara tepat.

Konsentrasi antigen dan antibodi juga menentukan kualitas interaksi yang terjadi. Secara prinsip, reaksi antigen-antibodi mengikuti hukum aksi massa, di mana peningkatan konsentrasi salah

satu komponen akan meningkatkan kemungkinan pembentukan kompleks imun hingga tercapai keseimbangan. Namun, dalam praktik IHK, penggunaan antibodi dengan konsentrasi terlalu tinggi dapat meningkatkan ikatan non-spesifik dan menghasilkan pewarnaan latar belakang (*background staining*) yang mengganggu interpretasi. Sebaliknya, konsentrasi yang terlalu rendah dapat menyebabkan hasil negatif palsu karena jumlah kompleks yang terbentuk tidak cukup untuk terdeteksi oleh sistem visualisasi. Oleh karena itu, setiap antibodi memerlukan proses titrasi untuk menentukan pengenceran kerja yang optimal sebelum digunakan secara rutin dalam diagnosis.

Salah satu faktor paling krusial dalam IHK adalah efek fiksasi formalin terhadap struktur antigen. Formalin bekerja dengan membentuk ikatan silang (*cross-link*) antar protein melalui jembatan metilen. Proses ini penting untuk mempertahankan arsitektur jaringan dan mencegah autolisis, tetapi konsekuensinya adalah perubahan konformasi protein dan tertutupnya epitop yang sebelumnya dapat dikenali oleh antibodi. Fenomena ini dikenal sebagai epitope masking. Jika fiksasi berlangsung terlalu singkat, jaringan dapat mengalami degradasi sehingga struktur antigen rusak. Sebaliknya, fiksasi yang terlalu lama dapat menyebabkan pembentukan ikatan silang berlebihan yang menyulitkan antibodi mengakses epitopnya. Variasi dalam durasi dan kualitas fiksasi inilah yang sering menjadi sumber variasi hasil IHK antar laboratorium.

Untuk mengatasi efek masking tersebut, dilakukan prosedur *antigen retrieval*, yaitu pemanasan jaringan dalam larutan bufer tertentu guna memutus sebagian ikatan silang dan mengembalikan

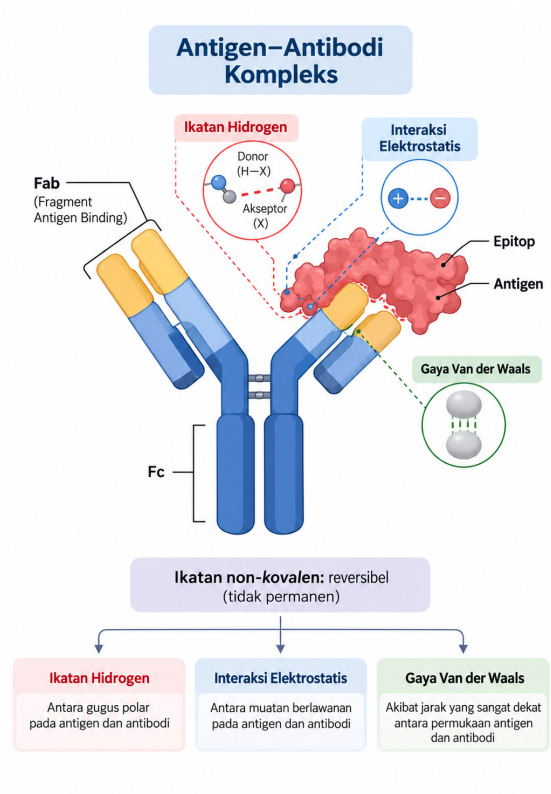
konfigurasi epitop mendekati kondisi semula. Keberhasilan *antigen retrieval* sangat menentukan tingkat afinitas efektif antara antibodi dan antigen dalam jaringan yang telah difiksasi. Tanpa proses ini, banyak antigen penting termasuk penanda proliferasi dan *marker immune checkpoint* tidak akan terdeteksi secara optimal.

Pemahaman mengenai faktor-faktor tersebut memiliki implikasi langsung dalam praktik klinis. Hasil IHK tidak semata-mata mencerminkan ekspresi biologis suatu protein, melainkan juga dipengaruhi oleh variabel pre-analitik dan analitik. Ekspresi yang tampak lemah atau negatif tidak selalu berarti ketiadaan antigen, tetapi dapat berkaitan dengan kondisi fiksasi, pH bufer, suhu inkubasi, atau konsentrasi antibodi yang digunakan. Oleh karena itu, interpretasi hasil IHK harus selalu mempertimbangkan konteks teknis dan klinis secara bersamaan.

Dengan memahami mekanisme dasar ikatan antigen-antibodi serta faktor-faktor yang memengaruhi afinitasnya, mahasiswa kedokteran gigi diharapkan mampu menilai hasil IHK secara lebih kritis dan tidak sekadar menerima laporan sebagai data absolut. Pendekatan ini akan memperkuat kemampuan analisis klinis dan meningkatkan kualitas komunikasi antara dokter gigi dan ahli patologi dalam pengelolaan kasus lesi rongga mulut.

2. Pemilihan dan Validasi Antibodi IHK

Antibodi merupakan komponen utama dalam metode IHK karena berperan langsung dalam pengenalan antigen target di dalam jaringan. Keberhasilan pewarnaan IHK sangat ditentukan



Gambar 2. Mekanisme Ikatan Antigen–Antibodi.

Ilustrasi diatas menunjukkan interaksi antara antibodi berbentuk huruf Y dan antigen yang memiliki epitop spesifik. Daerah Fab (*fragment antigen binding*) pada ujung antibodi berikatan dengan epitop antigen melalui interaksi non-kovalen yang bersifat reversibel, meliputi ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, dan gaya Van der Waals. Spesifisitas dan kekuatan ikatan ditentukan oleh kesesuaian struktur tiga dimensi antara paratop antibodi dan epitop antigen, sehingga membentuk kompleks antigen–antibodi yang stabil namun tidak permanen.

oleh ketepatan pemilihan antibodi serta proses validasi, karena spesifisitas dan sensitivitas antibodi dapat memengaruhi interpretasi biomarker (Howat, 2014; Hewit, 2014; Fitzgibbons, 2014). Antibodi yang tidak sesuai atau tidak tervalidasi dengan baik dapat menghasilkan pewarnaan yang tidak spesifik, interpretasi yang keliru, atau kesimpulan biologis yang menyesatkan.

Berdasarkan sifat dan cara pengenalannya terhadap antigen, antibodi yang digunakan dalam IHK dibedakan menjadi antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal. Pemahaman terhadap karakteristik masing-masing jenis antibodi penting untuk menentukan penggunaannya dalam konteks diagnostik maupun penelitian.

1. **Antibodi monoklonal** memiliki spesifisitas tinggi karena hanya mengenali satu epitop tertentu pada antigen. Sifat ini memungkinkan diperolehnya pewarnaan yang lebih selektif dan konsisten, sehingga antibodi monoklonal sering digunakan dalam pemeriksaan diagnostik.
2. **Antibodi poliklonal** mampu mengenali beberapa epitop pada antigen yang sama, sehingga memberikan sensitivitas yang lebih tinggi. Namun, kemampuan mengenali lebih dari satu epitop tersebut juga meningkatkan risiko terjadinya pewarnaan latar yang lebih tinggi apabila kondisi pemeriksaan tidak dioptimalkan (Ramos-Vara, 2005).

Selain jenis antibodi, aspek lain yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan antibodi adalah sumber antibodi, klon antibodi, serta kecocokannya dengan jaringan FFPE. Antibodi yang

dirancang dan diuji khusus untuk jaringan FFPE umumnya memberikan hasil yang lebih stabil dan dapat direproduksi, terutama pada pemeriksaan *biomarker* jaringan tumor.

Setelah antibodi dipilih, tahap berikutnya adalah validasi antibodi. Validasi bertujuan untuk memastikan bahwa antibodi benar-benar mengenali antigen target secara spesifik dan menghasilkan pola pewarnaan yang sesuai dengan karakter biologis antigen tersebut. Proses validasi antibodi dalam IHK mencakup beberapa aspek penting, antara lain:

1. Penggunaan jaringan kontrol positif untuk memastikan bahwa antibodi mampu mendeteksi antigen target dalam kondisi optimal.
2. Penggunaan kontrol negatif untuk menilai kemungkinan terjadinya pewarnaan non-spesifik atau reaksi latar.
3. Penentuan pengenceran antibodi yang optimal, sehingga diperoleh keseimbangan antara intensitas pewarnaan dan rendahnya *background staining*.
4. Evaluasi pola distribusi pewarnaan pada tingkat seluler, baik pada inti sel, sitoplasma, maupun membran sel, sesuai dengan lokasi biologis antigen.

Validasi antibodi juga melibatkan penilaian konsistensi hasil pewarnaan pada pemeriksaan berulang. Antibodi yang tervalidasi dengan baik akan menghasilkan pola pewarnaan yang seragam dan dapat direproduksi pada spesimen yang berbeda dengan karakteristik jaringan yang serupa.

Dalam bidang kedokteran gigi, pemilihan dan validasi antibodi memiliki peran yang sangat penting, terutama dalam evaluasi

biomarker tumor rongga mulut. Ekspresi protein dapat bervariasi antara jaringan normal, lesi pra-kanker, dan karsinoma sel skuamosa, sehingga ketelitian dalam pemilihan antibodi menjadi krusial. Kesalahan pada tahap ini tidak hanya memengaruhi interpretasi hasil IHK, tetapi juga dapat berdampak pada pemahaman karakter biologis tumor serta pengambilan keputusan klinis.

3. Label Deteksi dan Sistem Visualisasi

Dalam praktik IHK, visualisasi ikatan ikatan spesifik antara antigen dan antibodi secara mikroskopis adalah hal fundamental yang menjadi interpretasi hasil utama dalam penelitian. Proses visualisasi ini dilakukan melalui sistem deteksi yang menggunakan label tertentu untuk menghasilkan sinyal yang dapat dikenali, baik dalam bentuk warna maupun fluoresensi. Pemilihan sistem deteksi yang tepat sangat menentukan sensitivitas, spesifisitas, serta kejelasan interpretasi hasil IHK.

Secara umum, sistem deteksi dalam IHK memanfaatkan label yang dikonjugasikan pada antibodi sekunder atau pada sistem penguat sinyal. Label ini berfungsi sebagai penanda keberadaan kompleks antigen-antibodi di dalam jaringan. Sistem deteksi yang paling luas digunakan adalah sistem berbasis enzim, terutama karena stabilitas sinyal dan kemudahan interpretasinya dalam pemeriksaan rutin. Adapun sistem deteksi berbasis enzim yang umum digunakan adalah sebagai berikut:

1. *Horseradish peroxidase* (HRP) merupakan enzim yang paling sering digunakan, karena memiliki aktivitas tinggi dan kompatibel dengan berbagai kromogen.

2. *Alkaline phosphatase* (AP) digunakan sebagai alternatif, terutama pada kondisi tertentu yang memerlukan warna kontras berbeda atau untuk menghindari reaksi silang dengan enzim endogen tertentu.

Enzim yang digunakan dalam sistem deteksi kemudian direaksikan dengan substrat atau kromogen untuk menghasilkan produk berwarna pada lokasi antigen. Kromogen yang paling umum digunakan adalah *3,3'-diaminobenzidine* (DAB), yang menghasilkan endapan berwarna coklat pada area yang mengekspresikan antigen target. Warna coklat yang dihasilkan DAB bersifat stabil dan dapat bertahan dalam jangka waktu lama, sehingga sangat sesuai untuk dokumentasi dan evaluasi histopatologis (Buchwalow & Böcker, 2010).

Selain sistem berbasis enzim, IHC juga dapat dilakukan dengan sistem imunofluoresensi. Pada metode ini, antibodi dikonjugasikan dengan fluorokrom yang memancarkan cahaya pada panjang gelombang tertentu ketika disinari. Sistem ini memungkinkan deteksi multipel antigen dalam satu preparat jaringan dan banyak digunakan dalam konteks penelitian. Namun, keterbatasan stabilitas sinyal fluoresensi dan kebutuhan peralatan khusus menjadikan metode ini kurang umum digunakan dalam pemeriksaan diagnostik rutin.

Untuk meningkatkan sensitivitas dan mengurangi pewarnaan latar, dikembangkan berbagai sistem amplifikasi sinyal. Sistem ini memungkinkan penguatan sinyal tanpa meningkatkan konsentrasi antibodi primer secara berlebihan. Pendekatan tersebut mencakup penggunaan polimer berlabel enzim atau sistem biotin–streptavidin yang dirancang untuk meningkatkan

jumlah molekul enzim pada lokasi antigen. Pemilihan sistem amplifikasi harus dilakukan secara hati-hati, karena amplifikasi berlebihan dapat meningkatkan risiko pewarnaan non-spesifik.

Dalam konteks pemeriksaan tumor pada kedokteran gigi, sistem visualisasi yang baik sangat diperlukan untuk menilai intensitas dan distribusi ekspresi *biomarker* secara akurat. Visualisasi yang jelas memungkinkan penilaian pola pewarnaan, baik pada tingkat seluler maupun jaringan, yang selanjutnya dapat dikaitkan dengan derajat keganasan, aktivitas proliferasi, atau prognosis penyakit. Oleh karena itu, pemahaman mengenai prinsip kerja label deteksi dan sistem visualisasi merupakan bagian integral dari penerapan IHK yang andal dan bermakna secara klinis.

4. Kontrol Eksperimen dan Parameter Validitas

Kontrol eksperimen merupakan komponen esensial dalam IHK karena berfungsi untuk menjamin bahwa hasil pewarnaan yang diperoleh benar-benar mencerminkan ekspresi antigen target di dalam jaringan. Tanpa penerapan kontrol yang memadai, sulit untuk membedakan antara pewarnaan spesifik yang bermakna secara biologis dan pewarnaan non-spesifik yang dapat menyesatkan interpretasi. Oleh karena itu, penggunaan kontrol dan pemahaman terhadap parameter validitas menjadi bagian yang tidak terpisahkan dari prosedur IHK. Dalam praktik IHK, kontrol digunakan untuk menilai kinerja antibodi, sistem deteksi, serta keseluruhan prosedur pewarnaan. Kontrol yang paling umum digunakan meliputi:

- 1. Kontrol positif**, yaitu jaringan yang diketahui mengekspresikan antigen target. Kontrol positif membantu memastikan kemampuan sistem untuk mendeteksi antigen target, sedangkan kontrol negatif

membantu mengidentifikasi background staining atau reaksi non-spesifik (Leong, 2004; Fitzgibbons, 2014). Tidak munculnya pewarnaan pada kontrol positif menandakan adanya masalah pada antibodi, *antigen retrieval*, atau tahapan teknis lainnya.

2. Kontrol negatif, yang bertujuan untuk mengidentifikasi kemungkinan pewarnaan non-spesifik atau *background staining*. Kontrol ini biasanya dilakukan dengan menghilangkan antibodi primer atau menggantinya dengan antibodi non-imun, sehingga setiap pewarnaan yang muncul dapat diinterpretasikan sebagai reaksi non-spesifik.

Selain kontrol eksternal berupa jaringan pembanding, beberapa preparat juga menunjukkan adanya kontrol internal. Kontrol internal berupa sel atau struktur jaringan tertentu yang secara fisiologis mengekspresikan antigen target dan berada dalam satu preparat dengan jaringan yang diperiksa. Keberadaan kontrol internal sangat membantu dalam menilai keberhasilan pewarnaan, terutama ketika kontrol eksternal tidak tersedia.

Validitas hasil IHK tidak hanya ditentukan oleh keberadaan kontrol, tetapi juga oleh konsistensi dan standarisasi prosedur yang digunakan. Parameter validitas mencakup keseragaman tahapan fiksasi, pemrosesan jaringan, *antigen retrieval*, serta kondisi inkubasi antibodi. Variasi kecil pada salah satu tahapan tersebut dapat memengaruhi intensitas dan pola pewarnaan, sehingga berdampak pada interpretasi hasil. Oleh karena itu, penerapan prosedur yang terstandarisasi dan terdokumentasi dengan baik sangat diperlukan untuk memperoleh hasil yang dapat direproduksi.

Interpretasi hasil IHK juga merupakan bagian dari parameter validitas. Penilaian dapat dilakukan secara kualitatif berdasarkan ada atau tidaknya pewarnaan, maupun secara semi-kuantitatif dengan mempertimbangkan intensitas pewarnaan dan proporsi sel yang positif. Pendekatan ini memerlukan konsistensi kriteria interpretasi agar hasil pemeriksaan antar pengamat dan antar waktu tetap sebanding.

Dalam bidang kedokteran gigi, validitas pemeriksaan IHK memiliki implikasi klinis yang signifikan. Kesalahan dalam penerapan kontrol atau interpretasi hasil dapat berujung pada kesalahan diagnosis, penilaian derajat keganasan, maupun pemilihan strategi terapi. Oleh sebab itu, penerapan kontrol eksperimen yang tepat serta pemahaman menyeluruh terhadap parameter validitas merupakan prasyarat utama untuk menjamin akurasi dan reliabilitas pemeriksaan IHK dalam praktik klinis dan penelitian.

PERTANYAAN :

1. Bagaimana proses fiksasi formalin dapat memengaruhi struktur antigen dan epitop pada jaringan, dan mengapa teknik *antigen retrieval* diperlukan dalam IHK?
2. Mengapa pemilihan dan validasi antibodi menjadi tahap penting dalam IHK, serta bagaimana perbedaan antibodi monoklonal dan poliklonal dapat memengaruhi hasil pewarnaan?
3. Jelaskan fungsi sistem deteksi dalam IHK dan peran kontrol positif serta kontrol negatif dalam memastikan keandalan hasil pemeriksaan.

RINGKASAN:

IHK adalah teknik deteksi protein pada jaringan yang didasarkan pada reaksi spesifik antara antigen dan antibodi. Antigen memiliki bagian spesifik yang disebut epitop, sedangkan antibodi memiliki daerah variabel yang secara selektif mengenali epitop tersebut. Kekuatan interaksi antigen-antibodi dipengaruhi oleh afinitas dan aviditas, yang menentukan kestabilan ikatan serta kualitas dan kejelasan pewarnaan yang dihasilkan.

Jaringan yang digunakan dalam IHK umumnya telah difiksasi dengan formalin untuk mempertahankan struktur morfologi. Namun, fiksasi ini membentuk ikatan silang protein yang dapat menutupi epitop (*epitope masking*) sehingga menghambat pengikatan antibodi. Oleh karena itu, diperlukan teknik *antigen retrieval*, baik melalui pemanasan maupun enzim proteolitik, untuk memulihkan aksesibilitas epitop dan meningkatkan sensitivitas deteksi.

Keberhasilan IHK sangat bergantung pada pemilihan dan validasi antibodi. Antibodi monoklonal memiliki spesifisitas tinggi terhadap satu epitop, sedangkan antibodi poliklonal lebih sensitif karena mengenali beberapa epitop, tetapi berisiko meningkatkan pewarnaan non-spesifik. Proses validasi dilakukan menggunakan kontrol positif dan negatif, optimasi pengenceran antibodi, serta evaluasi pola distribusi pewarnaan sesuai lokasi biologis antigen.

Visualisasi kompleks antigen-antibodi dilakukan melalui sistem deteksi berbasis enzim (seperti HRP atau *alkaline phosphatase*) dengan kromogen yang menghasilkan warna pada lokasi antigen, atau melalui sistem imunofluoresensi. Penerapan kontrol eksperimen dan standarisasi

prosedur sangat penting untuk menjamin validitas, reproduktibilitas, serta akurasi hasil, terutama dalam evaluasi *biomarker* tumor yang berimplikasi langsung pada diagnosis dan keputusan terapi.

B. Protokol IHK: Langkah Teknis dan Variabel Proses

Protokol IHK terdiri atas serangkaian langkah teknis yang harus dilakukan secara sistematis untuk memperoleh hasil pewarnaan yang jelas, spesifik, dan dapat diinterpretasikan. Setiap tahap dalam protokol memiliki variabel proses yang dapat memengaruhi kualitas hasil akhir. Oleh karena itu, pemahaman terhadap langkah-langkah teknis ini sangat penting untuk menjamin konsistensi dan reproduktibilitas pemeriksaan.

1. Persiapan Slide dan *Dewaxing/Rehydration*

Preparat jaringan yang digunakan dalam IHK umumnya berasal dari jaringan yang telah difiksasi menggunakan formalin dan ditanam dalam parafin. Sebelum dilakukan pewarnaan IHK, *slide* harus melalui tahap persiapan awal untuk menghilangkan parafin dan mengembalikan jaringan ke kondisi terhidrasi.

Proses *dewaxing* dilakukan dengan merendam *slide* secara berurutan dalam pelarut nonpolar, umumnya xilena, untuk melarutkan parafin yang menutupi jaringan. Tahap ini sangat krusial karena residu parafin dapat menghambat penetrasi antibodi ke dalam jaringan dan menurunkan efisiensi reaksi imunologis. Setelah *dewaxing*, *slide* selanjutnya menjalani proses rehidrasi melalui rangkaian alkohol dengan konsentrasi menurun (misalnya 100%, 96%, 80%, dan 70%), kemudian dibilas menggunakan air suling atau bufer fosfat. Variabel yang memengaruhi tahap ini meliputi durasi perendaman pada masing-masing larutan, kemurnian pelarut, serta kondisi lingkungan laboratorium. *Dewaxing* yang tidak sempurna atau rehidrasi yang tidak merata dapat menyebabkan artefak jaringan, pewarnaan tidak

konsisten, atau hilangnya antigen target. Adapun dalam praktiknya, alat, bahan serta prosedur yang dibutuhkan dalam tahapan ini adalah sebagai berikut:

A. Alat

- rak slide (*slide holder*)
- *coplin jar* atau *staining jar*
- pipet ukur
- gelas ukur
- *timer*
- pinset
- lemari asam
- sarung tangan, masker, dan jas laboratorium

B. Bahan

- *slide jaringan formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)*
- xilena
- alkohol absolut (100%)
- alkohol 96%
- alkohol 80%
- alkohol 70%
- akuades
- *phosphate buffered saline (PBS)*

C. Prosedur Kerja

1. Persiapan Awal

- Pastikan *slide* jaringan dalam kondisi kering dan terlabel dengan benar.
- Siapkan seluruh larutan dalam *coplin jar* sesuai urutan

penggunaan.

- Lakukan prosedur di bawah lemari asam karena xilena bersifat toksik dan mudah menguap.

2. *Dewaxing*

- Masukkan *slide* ke dalam xilena I selama 5–10 menit.
- Pindahkan ke xilena II selama 5–10 menit.
- (Opsional) Lakukan perendaman tambahan pada xilena III jika jaringan tebal atau parafin masih terlihat.

Catatan:

Dewaxing harus sempurna. Residu parafin dapat menghambat penetrasi antibodi dan menurunkan kualitas pewarnaan.

3. Rehidrasi Bertahap

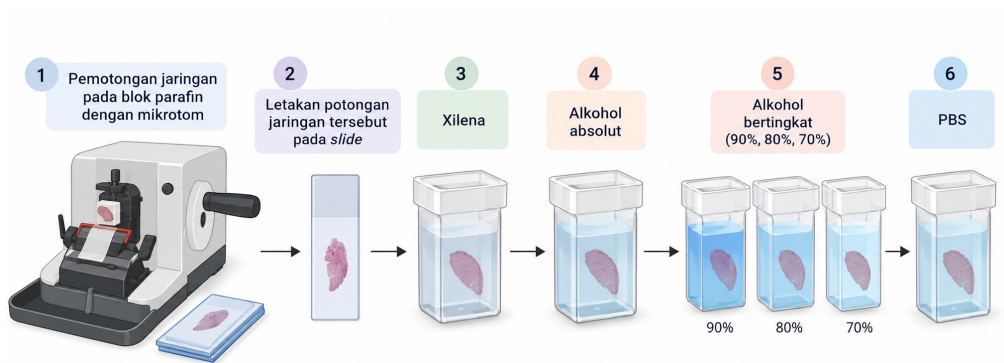
Lakukan perendaman berurutan sebagai berikut:

- alkohol 100% (3–5 menit)
- alkohol 100% (ulang) (3–5 menit)
- alkohol 96% (3–5 menit)
- alkohol 80% (3–5 menit)
- alkohol 70% (3–5 menit)

4. Pembilasan Akhir

- Bilas *slide* dalam air suling selama 3–5 menit.
- Lanjutkan pembilasan dengan PBS selama 5 menit jika akan langsung masuk tahap *antigen retrieval*.

Slide kini berada dalam kondisi terhidrasi dan siap untuk tahap berikutnya (*antigen retrieval*).



Gambar 3. Persiapan *slide* dan proses *dewaxing*/rehidrasi pada pemeriksaan IHC.

Ilustrasi **Gambar 3** menunjukkan tahapan awal preparasi jaringan untuk analisis IHC. Persiapan slide dimulai dari blok parafin yang dipotong menggunakan mikrotom untuk menghasilkan irisan jaringan tipis, kemudian ditempatkan pada kaca objek (*tissue slide*). Tahap *dewaxing* dilakukan menggunakan xilena untuk menghilangkan parafin dari jaringan, dilanjutkan dengan perendaman dalam alkohol 100% untuk proses dehidrasi. Selanjutnya dilakukan rehidrasi bertahap menggunakan etanol dengan konsentrasi menurun (100-70%), dan diakhiri dengan perendaman dalam larutan bufer hingga jaringan siap untuk tahap pewarnaan IHC berikutnya.

2. *Antigen Retrieval*: Metode dan Optimisasi

Fiksasi jaringan menggunakan formalin menyebabkan terbentuknya ikatan silang (*cross-linking*) antara protein, yang dapat menutupi epitop antigen dan menghambat pengikatan antibodi. Oleh karena itu, tahap *antigen retrieval* diperlukan untuk membuka kembali epitop antigen agar dapat dikenali secara optimal oleh antibodi primer.

Antigen retrieval umumnya dilakukan dengan dua pendekatan utama, yaitu *heat-induced epitope retrieval* (HIER) dan *enzymatic retrieval*. Metode HIER melibatkan pemanasan slide dalam larutan bufer tertentu, seperti bufer sitrat pH rendah atau bufer EDTA pH tinggi, menggunakan *microwave*, *water bath*, *pressure cooker*, atau *steamer* laboratorium. Pemanasan ini berfungsi memutus ikatan silang formalin sehingga struktur antigen kembali terekspos. Sebaliknya, metode enzimatik menggunakan enzim proteolitik, seperti proteinase K atau tripsin, untuk mendegradasi protein penutup epitop. Metode ini lebih selektif tetapi memiliki risiko kerusakan struktur jaringan apabila tidak dikontrol dengan baik.

Variabel kunci dalam *antigen retrieval* meliputi jenis bufer, pH larutan, suhu pemanasan, durasi perlakuan, serta jenis antigen yang ditargetkan. Optimisasi parameter ini sangat penting karena pemulihan yang tidak adekuat dapat menghasilkan pewarnaan lemah, sedangkan pemulihan yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan morfologi jaringan atau peningkatan *background staining*. Adapun dalam praktiknya, alat, bahan serta prosedur yang dibutuhkan dalam tahapan ini adalah sebagai berikut:

A. Alat

- rak slide tahan panas
- *coplin jar* / *staining jar* tahan panas

- *microwave / water bath / pressure cooker / steamer* laboratorium
- termometer
- *timer*
- pipet ukur / gelas ukur
- *fume hood* (jika diperlukan)
- sarung tangan dan APD lengkap

B. Bahan

Untuk Metode HIER:

- Bufer sitrat pH 6.0
- Bufer EDTA pH 8.0–9.0
- Akuades
- PBS

Untuk Metode Enzimatik:

- Proteinase K atau Trypsin
- Bufer
- PBS

C. Prosedur Kerja

Metode HIER:

- Siapkan bufer (misalnya bufer sitrat pH 6.0 atau EDTA pH 9.0).
- Panaskan bufer hingga suhu $\pm 95-100^{\circ}\text{C}$.
- Masukkan slide yang telah direhidrasi ke dalam bufer panas.
- Lakukan pemanasan selama 10–20 menit (tergantung protokol dan jenis antigen).
- Biarkan slide mendingin secara bertahap pada suhu ruang selama ± 20 menit.
- Bilas slide dengan PBS selama 5 menit dan *slide* siap untuk tahap *blocking*.

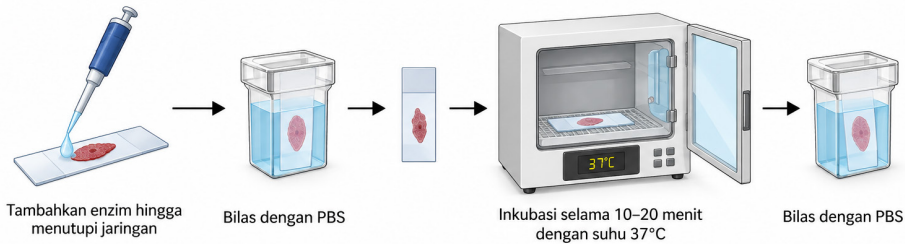
Metode *Enzymatic Retrieval*:

- Siapkan larutan enzim (misalnya proteinase K atau trypsin) sesuai konsentrasi yang direkomendasikan.
- Teteskan larutan enzim hingga menutupi jaringan pada slide.
- Inkubasi pada suhu 37°C selama 5–20 menit (sesuai protokol).
- Hentikan reaksi dengan membilas menggunakan PBS dan *slide* siap untuk tahap berikutnya.

Antigen Retrieval: Metode HIER



Antigen Retrieval: Metode Enzimatik



Gambar 4. Metode antigen *retrieval* pada IHC.

Menunjukkan metode HIER dengan pemanasan dalam bufer dan metode enzimatik dengan inkubasi enzim untuk membuka epitop antigen sebelum pewarnaan IHC.

3. Blokade Non Spesifik dan Reduksi *Background*

Tahap blokade merupakan tahapan yang bertujuan untuk mencegah ikatan non-spesifik antibodi pada jaringan, yang dapat menyebabkan pewarnaan latar belakang (*background staining*) dan menurunkan akurasi interpretasi hasil. Ikatan non-spesifik dapat terjadi akibat interaksi antibodi dengan protein jaringan, reseptor Fc, atau aktivitas enzim endogen.

Blokade non-spesifik biasanya dilakukan dengan menginkubasi slide menggunakan serum normal yang berasal dari spesies yang sama dengan antibodi sekunder, atau dengan larutan protein seperti *bovine* serum albumin (BSA). Selain itu, pada sistem deteksi berbasis enzim, diperlukan langkah tambahan untuk menghambat aktivitas enzim endogen, seperti peroksidase endogen, dengan menggunakan larutan H_2O_2 . Variabel yang berpengaruh pada tahap ini meliputi jenis agen blokade, konsentrasi larutan, waktu inkubasi, serta kondisi suhu. Blokade yang tidak optimal dapat menyebabkan pewarnaan difus atau sinyal palsu, sedangkan blokade yang terlalu kuat berpotensi menurunkan intensitas sinyal spesifik antigen. Adapun alat, bahan dan prosedur kerja dari tahapan ini adalah sebagai berikut:

A. Alat

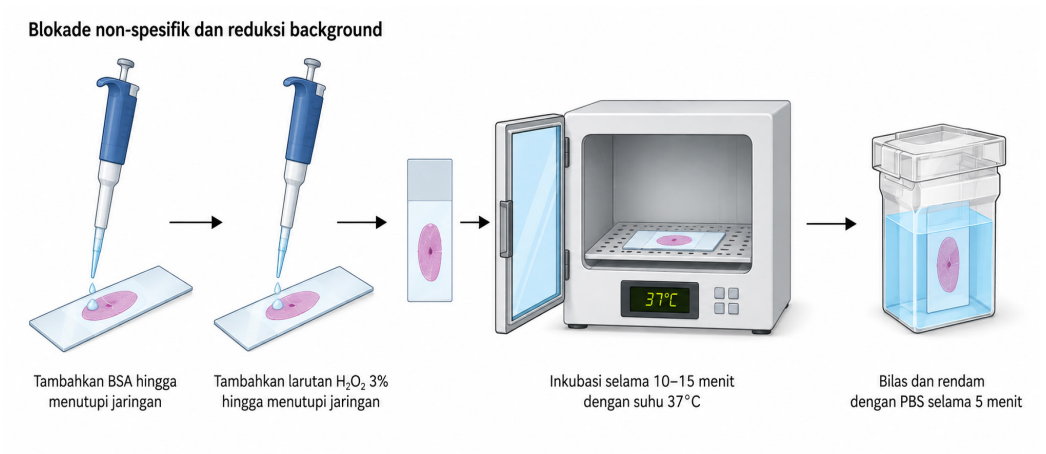
- rak slide dan *staining jar*
- pipet mikroliter dan tip steril
- inkubasi *chamber* (*humid chamber*)
- timer
- bufer fosfat (PBS)
- sarung tangan dan APD laboratorium

B. Bahan

- preparat jaringan pada *slide* (setelah tahap antigen *retrieval*)
- serum normal (sesuai spesies antibodi sekunder)
- larutan protein (misalnya albumin serum sapi/bsa 1–5%)
- larutan H_2O_2 3% (untuk blokade peroksidase endogen)
- bufer fosfat (PBS)
- akuades

C. Prosedur Kerja

1. Blokade Enzim Endogen (Jika Menggunakan Sistem Berbasis Peroksidase)
 - Letakkan slide pada rak pewarnaan.
 - Teteskan larutan H_2O_2 3% hingga menutupi seluruh jaringan.
 - Inkubasi selama 10–15 menit pada suhu ruang.
 - Bilas dengan PBS sebanyak 2–3 kali, masing-masing 3–5 menit.
 - Catatan: Tahap ini penting untuk mencegah pewarnaan latar akibat aktivitas peroksidase alami dalam jaringan.
2. Blokade Ikatan Non-Spesifik
 - Keringkan area sekitar jaringan (jangan sampai jaringan mengering).
 - Teteskan serum normal atau larutan BSA hingga seluruh jaringan tertutup.
 - Inkubasi selama 20–30 menit pada suhu ruang dalam *humid chamber*.
 - Buang larutan blokade dengan hati-hati (tidak perlu dibilas jika langsung dilanjutkan ke antibodi primer, kecuali protokol mensyaratkan pembilasan ringan).



Gambar 5. Blokade non-spesifik pada IHK.

Menunjukkan penggunaan serum normal atau BSA untuk mengurangi ikatan antibodi non-spesifik dan menekan pewarnaan latar belakang pada pemeriksaan IHK.

4. Deteksi, Kontras, dan Dokumentasi Hasil

Tahap deteksi antigen dimulai dengan inkubasi *slide* menggunakan antibodi primer yang spesifik terhadap antigen target. Antibodi ini akan berikatan secara selektif dengan epitop antigen pada jaringan. Inkubasi dapat dilakukan pada suhu ruang atau suhu rendah, tergantung karakteristik antibodi dan antigen, dengan durasi yang telah dioptimalkan.

Setelah antibodi primer, *slide* diinkubasi dengan antibodi sekunder yang terkonjugasi dengan sistem deteksi, seperti enzim *horse radish peroxidase* (HRP) atau *alkaline phosphatase*. Pada tahap ini, kompleks antigen-antibodi divisualisasikan melalui penambahan substrat kromogen, misalnya *diaminobenzidine* (DAB), yang menghasilkan endapan berwarna pada lokasi antigen.

Selanjutnya, dilakukan pewarnaan kontras (*counterstaining*), umumnya menggunakan hematoksin, untuk memberikan gambaran morfologi jaringan dan mempermudah identifikasi lokasi ekspresi antigen. Setelah proses pewarnaan selesai, *slide* mengalami dehidrasi ulang, *clearing*, dan *mounting* menggunakan media penutup permanen. Dokumentasi hasil dilakukan melalui observasi mikroskop cahaya dan perekaman citra digital. Evaluasi hasil meliputi analisis lokasi subseluler antigen, intensitas pewarnaan, serta proporsi sel positif. Variabel yang memengaruhi tahap ini mencakup spesifisitas antibodi, sistem deteksi yang digunakan, waktu reaksi kromogen, dan kualitas dokumentasi mikroskopis. Adapun dalam praktiknya, alat, bahan serta prosedur yang dibutuhkan dalam tahapan ini adalah sebagai berikut:

A. Alat

- *slide* preparat jaringan hasil tahap sebelumnya
- rak pewarnaan *slide*
- pipet mikro dan tip steril
- wadah inkubasi lembab (*humid chamber*)
- timer
- pinset preparat
- bufer
- gelas ukur
- mikroskop cahaya
- kamera mikroskop / sistem dokumentasi digital
- kaca penutup (*cover glass*)

B. Bahan

- antibodi primer spesifik antigen target
- antibodi sekunder terkonjugasi enzim (hrp atau fosfatase alkali)
- larutan bufer fosfat (pbs) atau bufer pencuci
- larutan kromogen dab (diaminobenzidin)
- hematoksin
- alkohol bertingkat (70%, 80%, 96%, 100%)
- xilena
- media *mounting* permanen
- akuades

C. Prosedur Kerja

1. Inkubasi Antibodi Primer

- Letakkan *slide* pada rak pewarnaan.
- Teteskan antibodi primer hingga seluruh jaringan tertutup.
- Inkubasi dalam ruang lembab selama 30–60 menit pada suhu ruang atau sesuai rekomendasi antibodi.

- Bilas *slide* menggunakan larutan bufer selama 3 kali masing-masing 3–5 menit.

2. Inkubasi Antibodi Sekunder

- Teteskan antibodi sekunder terkonjugasi enzim pada jaringan.
- Inkubasi selama 20–30 menit pada suhu ruang.
- Bilas menggunakan larutan bufer sebanyak 3 kali masing-masing 3–5 menit.

3. Visualisasi dengan Kromogen

- Teteskan larutan DAB pada jaringan.
- Inkubasi selama 3–10 menit hingga muncul warna coklat.
- Hentikan reaksi dengan membilas *slide* menggunakan air suling.

4. Pewarnaan Kontras (*Counterstaining*)

- Celupkan *slide* ke dalam larutan hematoksin selama 30 detik.
- Bilas dengan akuades hingga warna stabil.
- Keringkan bagian belakang *slide* dengan tisu laboratorium.

5. Dehidrasi dan *Clearing*

- Celupkan *slide* secara berurutan dalam alkohol:
 - alkohol 70% selama 2 menit
 - alkohol 80% selama 2 menit
 - alkohol 96% selama 2 menit
 - alkohol 100% selama 2 menit (2 kali)
- Celupkan *slide* dalam xilena selama 5 menit (2 kali).

6. Mounting Preparat

- Teteskan media *mounting* pada jaringan.
- Tutup dengan kaca penutup secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung udara.
- Biarkan preparat mengering.

7. Observasi dan Dokumentasi

- Amati preparat menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran rendah hingga tinggi.
- Identifikasi lokasi ekspresi antigen.

- Nilai intensitas pewarnaan antigen.
- Tentukan proporsi sel positif.
- Ambil gambar menggunakan kamera mikroskop untuk dokumentasi hasil.

5. Artefak Teknis dalam IHK dan Dampaknya terhadap Interpretasi

Pemeriksaan IHK merupakan metode yang sangat bergantung pada kualitas preparasi jaringan serta ketepatan prosedur teknis. Berbeda dengan teknik molekuler yang sepenuhnya berbasis analisis genetik, IHK melibatkan berbagai tahapan manual dan semi-otomatis yang berpotensi menimbulkan variasi hasil. Oleh karena itu, selain memahami pola ekspresi *marker* secara biologis, mahasiswa dan praktisi juga perlu memahami kemungkinan munculnya artefak teknis yang dapat memengaruhi interpretasi.

Artefak dalam konteks histopatologi adalah perubahan morfologi atau pola pewarnaan yang tidak mencerminkan kondisi biologis sebenarnya, melainkan timbul akibat proses teknis selama pengambilan, fiksasi, pemrosesan, pewarnaan, atau *mounting* preparat. Variasi pada fiksasi, pemrosesan jaringan, *antigen retrieval*, konsentrasi antibodi, sistem deteksi, dan kromogen dapat menghasilkan artefak atau pola pewarnaan yang menyesatkan (Engel, 2011; Leong, 2004). Artefak tidak selalu menghasilkan kesalahan diagnosis, namun jika tidak dikenali dengan baik, dapat meningkatkan risiko interpretasi yang kurang tepat.

a. *Edge Artifact*

Edge artifact (artefak tepi) merupakan fenomena di mana pewarnaan IHK tampak lebih kuat atau lebih lemah di bagian tepi jaringan dibandingkan bagian tengah. Kondisi ini sering terjadi pada jaringan kecil, biopsi insisi, atau potongan jaringan yang relatif tipis.

Secara teknis, perbedaan intensitas ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor. Pada tahap fiksasi, bagian tepi jaringan lebih cepat terpapar formalin sehingga mengalami penetrasi fiksatif yang lebih

optimal dibandingkan bagian tengah. Sebaliknya, pada beberapa kondisi, bagian tepi dapat mengalami fiksasi berlebih atau dehidrasi lebih cepat, yang justru memengaruhi aksesibilitas epitop. Selain itu, selama proses pewarnaan, reagen antibodi dan larutan deteksi dapat lebih mudah mengakses area tepi dibandingkan area sentral yang lebih padat.

Secara mikroskopik, *edge artifact* dapat tampak sebagai pewarnaan yang lebih intens pada perimeter jaringan, sehingga berpotensi disalahartikan sebagai overekspresi *marker*. Pada *marker* proliferasi seperti Ki-67 atau protein onkogenik tertentu, intensitas tinggi di tepi dapat menimbulkan kesan peningkatan ekspresi yang sebenarnya tidak merata. Untuk menghindari interpretasi yang kurang tepat, evaluasi IHK sebaiknya tidak hanya berfokus pada satu area. Interpretasi dilakukan dengan membandingkan pola pewarnaan pada berbagai bagian jaringan, serta mempertimbangkan konsistensi distribusi sel positif. Pewarnaan yang hanya dominan di tepi tanpa pola difus atau konsisten umumnya lebih mengarah pada artefak teknis dibandingkan fenomena biologis.

b. Drying Artifact

Drying artifact (artefak pengeringan) terjadi ketika jaringan mengalami pengeringan sebelum atau selama proses fiksasi dan pewarnaan. Pengeringan dapat terjadi pada tahap pra-fiksasi, misalnya bila jaringan dibiarkan terlalu lama di udara setelah biopsi sebelum dimasukkan ke dalam fiksatif. Selain itu, artefak ini juga dapat muncul apabila potongan jaringan pada kaca objek tidak segera direndam dalam bufer atau reagen setelah proses tertentu.

Secara morfologis, drying artifact dapat menyebabkan perubahan struktur sel seperti retraksi sitoplasma, distorsi inti, atau peningkatan pewarnaan latar belakang (*background staining*). Pada pemeriksaan IHK, pengeringan dapat meningkatkan ikatan non-spesifik antibodi, sehingga muncul pewarnaan yang lebih luas dan kurang terlokalisasi. Pola pewarnaan akibat *drying artifact* sering kali tampak tidak teratur, granular, atau menyebar tanpa batas anatomi yang jelas. Pada beberapa kasus, seluruh area jaringan dapat menunjukkan pewarnaan latar belakang yang tinggi, sehingga menyulitkan identifikasi sel positif yang sebenarnya.

Pencegahan artefak ini bergantung pada penanganan spesimen yang baik. Jaringan hasil biopsi sebaiknya segera dimasukkan ke dalam larutan fiksatif dengan rasio volume yang memadai. Selain itu, selama prosedur IHK, potongan jaringan harus dijaga agar tetap terhidrasi sesuai protokol. Standarisasi prosedur laboratorium dan pelatihan teknis yang baik menjadi kunci dalam meminimalkan kejadian ini.

c. *Overstaining*

Overstaining mengacu pada intensitas pewarnaan yang terlalu kuat sehingga mengaburkan detail morfologi sel atau menyulitkan diferensiasi antara sel positif dan negatif. Kondisi ini dapat disebabkan oleh konsentrasi antibodi primer yang terlalu tinggi, waktu inkubasi yang terlalu lama, atau sistem deteksi yang terlalu sensitif.

Dalam konteks IHK, *overstaining* tidak selalu berarti ekspresi biologis yang tinggi. Intensitas yang sangat kuat pada seluruh jaringan,

termasuk sel yang secara biologis tidak seharusnya mengekspresikan *marker* tersebut, perlu dievaluasi secara kritis. *Overstaining* juga dapat meningkatkan pewarnaan latar belakang, sehingga batas antara ekspresi spesifik dan non-spesifik menjadi kurang jelas. Sebagai contoh, pada *marker* membran seperti E-cadherin atau EMA, *overstaining* dapat membuat seluruh membran sel tampak sangat tebal dan gelap, sehingga menyulitkan penilaian pola ekspresi yang sebenarnya. Pada *marker* nuklear seperti p53 atau Ki-67, *overstaining* dapat menyebabkan inti tampak sangat pekat hingga detail kromatin tidak terlihat dengan jelas.

Untuk mengurangi risiko *overstaining*, diperlukan optimasi protokol, termasuk titrasi antibodi primer, pengaturan waktu inkubasi, serta penggunaan kontrol positif dan negatif pada setiap sesi pewarnaan. Kontrol internal dalam jaringan juga sangat penting untuk memastikan bahwa intensitas pewarnaan berada dalam rentang yang dapat diinterpretasikan secara akurat.

Penting untuk ditekankan bahwa keberadaan artefak teknis tidak secara otomatis menghasilkan diagnosis yang salah. Interpretasi IHC merupakan proses integratif yang mempertimbangkan morfologi histologis, distribusi sel positif, intensitas pewarnaan, serta korelasi dengan data klinis dan pemeriksaan lain.

Mahasiswa kedokteran gigi perlu memahami bahwa IHC bukanlah pemeriksaan yang berdiri sendiri. Hasilnya harus dibaca dalam konteks gambaran hematoksilin-eosin (H&E) dan informasi klinis pasien. Pewarnaan yang tidak konsisten, terlalu terbatas pada tepi, terlalu difus tanpa pola anatomis, atau menunjukkan latar belakang tinggi sebaiknya dievaluasi

ulang sebelum diambil kesimpulan diagnostik.

Pendekatan yang sistematis dimulai dari evaluasi kualitas preparat, pengenalan kemungkinan artefak, hingga korelasi klinikopatologis akan membantu meminimalkan risiko interpretasi yang kurang tepat. Dengan pemahaman yang baik mengenai artefak teknis seperti *edge artifact*, *drying artifact*, dan *overstaining*, pembaca diharapkan mampu menilai hasil IHK secara lebih kritis, objektif, dan bertanggung jawab.

PERTANYAAN:

1. Mengapa proses *dewaxing*/rehidrasi dan *antigen retrieval* merupakan tahap penting dalam protokol IHK, serta bagaimana kesalahan pada kedua tahap tersebut dapat memengaruhi hasil pewarnaan?
2. Jelaskan tujuan tahap blokade non-spesifik dan peran sistem deteksi serta pewarnaan kontras dalam menghasilkan preparat IHK yang jelas dan mudah diinterpretasikan.

RINGKASAN:

Protokol IHK merupakan rangkaian langkah teknis yang dilakukan secara sistematis untuk menghasilkan pewarnaan antigen yang spesifik, jelas, dan dapat diinterpretasikan dengan baik. Setiap tahapan memiliki variabel proses seperti waktu inkubasi, suhu, jenis larutan, dan konsentrasi reagen yang dapat memengaruhi kualitas hasil, sehingga diperlukan prosedur yang konsisten dan terstandar.

Tahap pertama adalah persiapan slide serta *dewaxing* dan rehidrasi, yang bertujuan menghilangkan parafin dari jaringan dan mengembalikan jaringan ke kondisi terhidrasi. *Dewaxing* dilakukan menggunakan xilena, kemudian dilanjutkan dengan rehidrasi bertahap menggunakan alkohol konsentrasi menurun dan pembilasan dengan akuades atau bufer fosfat. Tahap ini penting karena sisa parafin dapat menghambat penetrasi antibodi dan menurunkan kualitas pewarnaan.

Tahap kedua adalah antigen *retrieval*, yang bertujuan membuka kembali epitop antigen yang tertutup akibat proses fiksasi formalin. *Antigen retrieval* dapat dilakukan dengan metode pemanasan dalam larutan bufer (*heat-induced epitope retrieval*) atau menggunakan enzim proteolitik (*enzymatic retrieval*). Parameter seperti jenis bufer, pH, suhu, dan durasi perlakuan harus dioptimalkan agar antigen dapat terdeteksi dengan baik tanpa merusak struktur jaringan.

Tahap ketiga adalah blokade non-spesifik dan reduksi *background*, yang bertujuan mencegah ikatan antibodi yang tidak spesifik pada jaringan. Blokade dilakukan menggunakan serum normal atau larutan

protein seperti BSA, serta dapat dilengkapi dengan blokade enzim endogen menggunakan hidrogen peroksida. Tahap ini penting untuk mengurangi pewarnaan latar belakang dan meningkatkan spesifisitas deteksi antigen.

Tahap terakhir adalah deteksi antigen, pewarnaan kontras, dan dokumentasi hasil. Antigen dideteksi melalui inkubasi antibodi primer dan antibodi sekunder yang terkonjugasi enzim, kemudian divisualisasikan menggunakan kromogen seperti DAB. Setelah itu dilakukan pewarnaan kontras dengan hematoksin, diikuti proses dehidrasi, *clearing*, dan *mounting*. Preparat kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dan didokumentasikan secara digital untuk analisis lokasi antigen, intensitas pewarnaan, dan proporsi sel positif.

Secara keseluruhan, keberhasilan pemeriksaan IHK sangat dipengaruhi oleh ketepatan pelaksanaan setiap tahapan protokol serta pengendalian variabel proses yang dapat memengaruhi spesifisitas dan kualitas pewarnaan antigen.

C. Teknik Lanjutan: Multiplex IHK dan Imunofluoresens

Teknik IHK terus berkembang dari metode deteksi tunggal menjadi pendekatan multiparameter yang mampu menganalisis beberapa *biomarker* secara simultan dalam satu preparat jaringan. Perkembangan ini sangat penting dalam studi tumor kedokteran gigi, karena proses keganasan melibatkan interaksi kompleks antara sel tumor, sel imun, dan jaringan mikro lingkungan. Multiplex IHK dan imunofluoresens memungkinkan pemetaan ekspresi protein secara lebih komprehensif serta analisis hubungan spasial antar sel.

1. Strategi Multiplex Kromogenik

Multiplex kromogenik merupakan teknik yang memungkinkan deteksi beberapa antigen dalam satu slide jaringan dengan menggunakan kombinasi kromogen yang menghasilkan warna berbeda. Pada teknik ini, setiap antigen dideteksi secara berurutan melalui siklus inkubasi antibodi dan deposisi kromogen, sehingga terbentuk pola pewarnaan *multicolour* yang dapat dibedakan dengan jelas di bawah mikroskop cahaya. Pendekatan ini memberikan keuntungan karena memungkinkan evaluasi beberapa *biomarker* secara simultan tanpa menghilangkan konteks morfologi jaringan.

Keunggulan lain dari strategi ini adalah kompatibilitasnya dengan prosedur histopatologi rutin. Struktur jaringan tetap terjaga dengan baik sehingga hubungan antara ekspresi *biomarker* dan arsitektur jaringan dapat diamati secara langsung. Dalam pelaksanaannya, pemilihan

kromogen menjadi aspek penting, karena warna yang dihasilkan harus memiliki kontras yang jelas dan tidak saling menutupi. Kombinasi warna seperti coklat (DAB), merah (AEC atau *Fast Red*), serta biru atau ungu sering digunakan untuk meningkatkan diferensiasi visual antar antigen.

Namun demikian, keberhasilan multiplex kromogenik sangat bergantung pada optimisasi urutan pewarnaan dan pengendalian reaksi silang antar antibodi. Setiap antibodi harus diuji kompatibilitasnya untuk memastikan bahwa proses pewarnaan pada satu tahap tidak mengganggu deteksi antigen pada tahap berikutnya. Pengaturan urutan aplikasi antibodi dan kromogen menjadi langkah penting untuk mempertahankan spesifisitas sinyal.

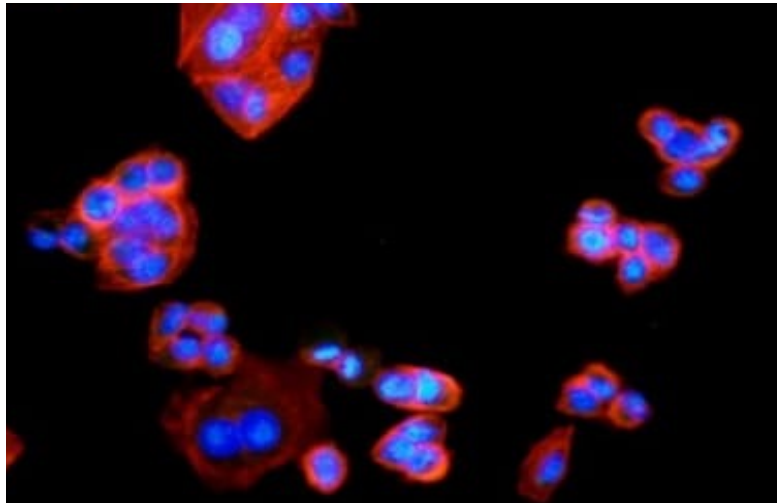
Sebagai contoh penerapan pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut, multiplex kromogenik dapat digunakan untuk mendeteksi secara simultan beberapa *biomarker* penting, seperti Ki-67 sebagai penanda proliferasi sel, p53 sebagai indikator gangguan regulasi siklus sel, dan CD8 sebagai penanda infiltrasi limfosit sitotoksik. Analisis gabungan *biomarker* tersebut memungkinkan evaluasi hubungan antara aktivitas proliferasi tumor dan respons imun lokal dalam satu bidang pengamatan, sehingga memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai karakter biologis tumor.

2. Imunofluoresens dan *Imaging* Kuantitatif

Imunofluoresens menggunakan antibodi berlabel fluorokrom untuk menghasilkan sinyal cahaya pada panjang gelombang tertentu. Dengan menggunakan beberapa fluorokrom yang memiliki

spektrum emisi berbeda, beberapa antigen dapat divisualisasikan secara simultan dalam satu preparat. Teknik ini sangat bermanfaat untuk mempelajari ko-lokalisasi protein dan interaksi subseluler. Penggunaan mikroskop fluoresens atau konfokal memungkinkan pengamatan resolusi tinggi terhadap distribusi antigen di dalam sel.

Perkembangan sistem imaging kuantitatif memungkinkan pengukuran intensitas fluoresens secara objektif menggunakan perangkat lunak analisis citra. Pendekatan ini dapat digunakan untuk menghitung persentase sel positif, densitas sinyal, dan distribusi spasial *biomarker*. Sebagai contoh, dalam penelitian lesi pra-kanker rongga mulut, imunofluoresens dapat digunakan untuk mengevaluasi ekspresi simultan seperti *marker* E-cadherin sebagai penanda adhesi sel, vimentin sebagai indikator transisi epitel mesenkimal dan DAPI sebagai penanda inti sel. Analisis kuantitatif memungkinkan penilaian perubahan fenotip sel yang berkaitan dengan progresi keganasan. Keterbatasan utama imunofluoresens adalah potensi pemudaran sinyal (*photobleaching*) dan kebutuhan peralatan khusus. Oleh karena itu, prosedur dokumentasi harus dilakukan secara konsisten dan cepat.



Gambar 6. Citra imunofluoresens sel yang menunjukkan organisasi sitoskeleton dan inti sel. Filamen aktin (F-actin) divisualisasikan menggunakan *phalloidin* berfluoresensi merah, sedangkan inti sel diwarnai dengan DAPI (biru). Kombinasi pewarnaan ini memungkinkan pengamatan hubungan antara struktur sitoskeleton dan morfologi inti sel menggunakan mikroskop floresen.

3. Analisis Multipleks dan *Unmixing* Sinyal

Dalam sistem IHK multipleks tingkat lanjut, penggunaan beberapa fluorofor atau kromogen secara simultan sering menimbulkan fenomena tumpang tindih spektrum (*spectral overlap*). Tumpang tindih ini menyebabkan sinyal dari satu penanda bercampur dengan sinyal penanda lain sehingga interpretasi visual menjadi kurang akurat. Untuk mengatasi keterbatasan tersebut digunakan pendekatan *spectral unmixing*, yaitu teknik pemisahan sinyal berdasarkan karakteristik spektral masing-masing fluorofor dengan bantuan algoritma komputasional dan perangkat lunak analitik.

Spectral unmixing bekerja dengan prinsip bahwa setiap fluorofor memiliki tanda spektral unik berupa kurva emisi tertentu. Pada tahap awal dilakukan akuisisi citra multispektral menggunakan mikroskop fluoresens atau sistem pencitraan konfokal yang mampu merekam rentang panjang gelombang secara terpisah. Data spektral yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan model matematis untuk menguraikan kontribusi masing-masing fluorofor pada setiap piksel citra. Proses ini menghasilkan peta distribusi sinyal yang lebih murni sehingga setiap *biomarker* dapat diidentifikasi secara spesifik meskipun berada pada lokasi yang sangat berdekatan di dalam jaringan. Selain pemisahan sinyal, analisis multipleks modern juga melibatkan kuantifikasi berbasis piksel dan segmentasi seluler. Perangkat lunak analitik mampu mengenali batas sel, membedakan kompartemen subseluler seperti inti dan sitoplasma, serta menghitung intensitas ekspresi protein secara

kuantitatif. Pendekatan ini memungkinkan evaluasi ko-ekspresi beberapa *biomarker* dalam satu sel sekaligus, sehingga memberikan informasi yang lebih mendalam mengenai status biologis jaringan.

Sebagai contoh, pada studi mikro-lingkungan tumor rongga mulut, penanda imun seperti CD4, CD8, PD-L1, dan Ki-67 dapat dianalisis secara simultan dalam satu preparat jaringan. Dengan bantuan *unmixing* sinyal, distribusi masing-masing populasi sel imun, tingkat proliferasi tumor, serta ekspresi molekul imunomodulator dapat dipetakan secara akurat tanpa interferensi spektral. Hasil analisis ini memungkinkan peneliti mengevaluasi hubungan spasial antara sel tumor dan sel imun, termasuk pola infiltrasi limfosit dan heterogenitas ekspresi *biomarker*.

Pendekatan *spectral unmixing* juga berperan penting dalam meningkatkan rasio sinyal terhadap latar belakang dan mengurangi artefak autofluoresens jaringan, yang sering menjadi kendala pada jaringan FFPE. Dengan mengisolasi komponen autofluoresens sebagai spektrum tersendiri, sistem analitik dapat mengurangkannya dari citra akhir sehingga meningkatkan kejernihan visualisasi.

Secara keseluruhan, integrasi analisis multiplex dan teknik *unmixing* sinyal memperluas kemampuan IHC modern dari sekadar observasi kualitatif menjadi platform analisis kuantitatif berbasis data. Pendekatan ini sangat penting dalam penelitian kedokteran gigi molekuler, khususnya untuk memahami heterogenitas tumor, interaksi seluler kompleks, serta dinamika ekspresi *biomarker* pada tingkat mikroskopis.

4. Integrasi IHC Multipleks dengan Analisis *Spatial Biology*

Integrasi IHC multipleks dengan pendekatan *spatial biology* merepresentasikan perkembangan penting dalam analisis *biomarker* jaringan modern. Pendekatan ini memungkinkan evaluasi ekspresi protein tidak hanya pada tingkat kuantitatif, tetapi juga dalam konteks organisasi spasial jaringan. Dengan demikian, analisis tidak terbatas pada identifikasi keberadaan *biomarker*, melainkan mencakup pemetaan hubungan posisi antar sel, arsitektur mikro-lingkungan jaringan, serta interaksi fungsional antar populasi sel.

Spatial biology bertumpu pada kombinasi pencitraan resolusi tinggi, pelabelan multipleks, dan analisis komputasional berbasis citra. Setelah preparat jaringan diwarnai menggunakan panel antibodi multipleks, citra digital beresolusi tinggi diperoleh melalui sistem *whole-slide imaging* atau mikroskop konfokal. Citra ini kemudian diproses menggunakan algoritma segmentasi sel dan analisis spasial untuk mengidentifikasi tipe sel, menentukan posisi relatifnya, serta menghitung parameter jarak dan kepadatan seluler. Pendekatan ini menghasilkan peta spasial tiga dimensi yang menggambarkan organisasi mikro-lingkungan jaringan secara komprehensif.

Dalam konteks patologi tumor rongga mulut, integrasi IHC multiplex dengan *spatial biology* memungkinkan evaluasi beberapa aspek biologis penting, antara lain:

1. Distribusi dan pola infiltrasi sel imun

Distribusi dan pola infiltrasi sel imun di sekitar massa tumor, termasuk identifikasi zona imunologis aktif dan area imunosupresi.

2. Hubungan spasial

Hubungan spasial antara area proliferasi tinggi dan jaringan vaskular, yang berperan dalam suplai nutrisi dan potensi metastasis.

3. Pola invasi

Pola invasi sel tumor ke jaringan stroma sekitarnya, yang mencerminkan agresivitas biologis dan potensi penyebaran lokal.

4. Heterogenitas intratumoral

Heterogenitas intratumoral yaitu variasi ekspresi *biomarker* pada berbagai wilayah tumor yang dapat memengaruhi respons terapi.

Analisis spasial ini memberikan wawasan mendalam mengenai dinamika interaksi seluler dalam mikro-lingkungan tumor. Informasi tersebut sangat relevan untuk memahami mekanisme progresi penyakit, prediksi prognosis, serta identifikasi target terapi yang lebih presisi. Pendekatan *spatial biology* juga memungkinkan pengembangan model kuantitatif yang mengaitkan pola organisasi jaringan dengan parameter klinis. Implementasi teknik ini memerlukan integrasi multidisipliner antara laboratorium histopatologi, sistem pencitraan digital canggih, dan platform bioinformatika. Proses kerja mencakup standarisasi protokol pewarnaan multipleks, kalibrasi sistem pencitraan, manajemen data citra berskala besar, serta interpretasi statistik berbasis komputasi. Meskipun teknologi ini masih terus berkembang dan memerlukan sumber daya teknis yang tinggi, *spatial biology* semakin menjadi komponen penting dalam penelitian *biomarker* modern, khususnya dalam bidang onkologi kedokteran gigi dan kedokteran presisi.

PERTANYAAN:

1. Jelaskan perbedaan prinsip kerja antara multipleks kromogenik dan imunofluoresens dalam deteksi beberapa *biomarker* pada satu preparat jaringan, serta sebutkan kelebihan utama masing-masing teknik.
2. Mengapa teknik *spectral unmixing* diperlukan dalam analisis multiplex tingkat lanjut, dan bagaimana perannya dalam meningkatkan akurasi identifikasi *biomarker* yang memiliki spektrum sinyal saling tumpang tindih?
3. Bagaimana integrasi IHK multipleks dengan pendekatan *spatial biology* dapat membantu memahami mikro-lingkungan tumor, dan informasi biologis apa saja yang dapat diperoleh dari analisis spasial tersebut?

RINGKASAN:

Teknik IHK telah berkembang dari metode deteksi tunggal menjadi pendekatan multipleks yang memungkinkan analisis beberapa *biomarker* secara simultan dalam satu preparat jaringan. Pendekatan ini sangat penting dalam studi tumor kedokteran gigi karena proses keganasan melibatkan interaksi kompleks antara sel tumor, sel imun, dan mikro-lingkungan jaringan. Multipleks IHK dan imunofluoresens memungkinkan analisis ekspresi protein secara komprehensif sekaligus mempertahankan konteks morfologi jaringan.

Multiplex kromogenik memungkinkan deteksi beberapa antigen dalam satu *slide* menggunakan kombinasi kromogen dengan warna berbeda yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Teknik ini kompatibel dengan prosedur histopatologi rutin dan memungkinkan evaluasi hubungan antara *biomarker* dan struktur jaringan. Keberhasilan metode ini bergantung pada pemilihan kromogen yang tepat serta optimisasi urutan antibodi untuk mencegah reaksi silang.

Imunofluoresens multiplex menggunakan antibodi berlabel fluorokrom untuk mendeteksi beberapa antigen secara simultan dengan resolusi tinggi. Teknik ini memungkinkan analisis ko-lokalisasi protein dan interaksi subseluler serta dapat dikombinasikan dengan sistem imaging kuantitatif untuk mengukur intensitas sinyal dan distribusi *biomarker* secara objektif. Namun, metode ini memerlukan peralatan khusus dan memiliki keterbatasan berupa pemudaran sinyal fluoresens.

Pada sistem multipleks tingkat lanjut, penggunaan banyak fluorofor dapat menyebabkan tumpang tindih spektrum, sehingga diperlukan teknik

spectral unmixing untuk memisahkan sinyal berdasarkan karakteristik spektralnya. Pendekatan ini memungkinkan identifikasi *biomarker* secara lebih akurat, meningkatkan rasio sinyal terhadap latar belakang, serta mengurangi interferensi *autofluoresens* jaringan.

Perkembangan lebih lanjut adalah integrasi IHK multipleks dengan pendekatan *spatial biology*, yang memungkinkan analisis *biomarker* dalam konteks organisasi spasial jaringan. Pendekatan ini memanfaatkan pencitraan resolusi tinggi dan analisis komputasional untuk memetakan distribusi sel, hubungan antar sel, pola infiltrasi imun, heterogenitas tumor, serta interaksi mikro-lingkungan jaringan. Integrasi teknologi ini memperluas fungsi IHK dari metode observasi kualitatif menjadi platform analisis kuantitatif dan spasial yang penting dalam penelitian *biomarker* dan kedokteran presisi. Secara keseluruhan, teknik IHK multiplex dan analisis spasial memberikan pemahaman yang lebih mendalam mengenai heterogenitas tumor dan interaksi seluler, sehingga berperan penting dalam penelitian onkologi modern dan pengembangan terapi yang lebih tepat sasaran.

D. Troubleshooting, Reprodusibilitas, dan Dokumentasi Laboratorium

Pelaksanaan IHK di laboratorium tidak hanya bergantung pada protokol teknis, tetapi juga pada kemampuan mengidentifikasi masalah, menjaga konsistensi hasil, serta mendokumentasikan setiap tahapan kerja. Reprodusibilitas menjadi aspek krusial karena hasil IHK sering digunakan untuk interpretasi diagnostik maupun penelitian *biomarker*.

1. Masalah Umum dan Solusi Praktis

Dalam praktik IHK, beberapa masalah teknis sering muncul dan dapat memengaruhi kualitas pewarnaan. Identifikasi dini terhadap sumber kesalahan membantu mencegah interpretasi yang keliru. Adapun masalah yang umum dijumpai meliputi:

a. Pewarnaan lemah atau tidak muncul

Dapat disebabkan oleh *antigen retrieval* yang tidak optimal, antibodi terlalu encer, atau degradasi antigen. Solusi praktis meliputi optimisasi *bufer retrieval*, penyesuaian konsentrasi antibodi, serta verifikasi kondisi penyimpanan reagen.

b. Background tinggi atau pewarnaan non-spesifik

Sering terjadi akibat blokade yang tidak memadai atau inkubasi antibodi yang terlalu lama. Penggunaan *blocking agent* yang sesuai dan pengurangan waktu inkubasi dapat menurunkan sinyal non-spesifik.

c. Pewarnaan tidak merata

Dapat disebabkan oleh pengeringan *slide* selama inkubasi atau distribusi reagen yang tidak

homogen. Menjaga kelembapan ruang inkubasi dan memastikan penutupan reagen merata sangat penting.

d. Artefak jaringan

Berasal dari fiksasi berlebihan, pemotongan jaringan yang kurang baik, atau kesalahan mounting. Kontrol kualitas pada tahap preparasi jaringan menjadi kunci pencegahan.

Pendekatan *troubleshooting* yang sistematis merupakan bagian penting dalam kontrol mutu IHK karena memungkinkan identifikasi sumber kesalahan secara terstruktur. Evaluasi dilakukan dengan menelusuri setiap komponen proses, mulai dari kualitas preparasi jaringan, efektivitas reagen, hingga ketepatan prosedur teknis. Pemeriksaan jaringan mencakup kondisi fiksasi, ketebalan irisan, dan integritas morfologi, sedangkan evaluasi reagen meliputi stabilitas antibodi, masa simpan, serta kondisi penyimpanan. Di sisi lain, aspek prosedural mencakup optimisasi *antigen retrieval*, waktu inkubasi, suhu reaksi, dan teknik pencucian. Dengan memisahkan analisis berdasarkan kategori tersebut, operator dapat menentukan sumber masalah secara lebih akurat dan menerapkan tindakan korektif yang sesuai. Pendekatan ini tidak hanya meningkatkan kualitas pewarnaan, tetapi juga memperkuat konsistensi dan reproduksibilitas hasil antar percobaan.

2. *Standard Operating Procedures* dan Validasi *Batch*

Standard operating procedures (SOP) merupakan kerangka kerja operasional yang memastikan setiap tahapan IHK dilakukan secara konsisten, terkontrol, dan dapat direproduksi. Dalam laboratorium

diagnostik maupun penelitian, SOP berfungsi sebagai pedoman tertulis yang mengatur seluruh alur kerja, mulai dari penerimaan sampel hingga interpretasi hasil. Keberadaan SOP yang terdokumentasi dengan baik sangat penting untuk meminimalkan variasi antar operator dan menjaga stabilitas kualitas hasil pewarnaan.

SOP IHK mencakup spesifikasi teknis yang rinci mengenai preparasi jaringan, termasuk jenis fiksatif, lama fiksasi, metode pemrosesan jaringan, serta standar ketebalan irisan. Selain itu, SOP harus mengatur prosedur *dewaxing*, rehidrasi, *antigen retrieval*, inkubasi antibodi primer dan sekunder, sistem deteksi, hingga tahap *counterstaining* dan *mounting*. Parameter seperti suhu inkubasi, waktu reaksi, komposisi bufer, dan metode pencucian perlu didefinisikan secara presisi untuk mengurangi variasi eksperimental. Aspek penting lain dalam SOP adalah pengelolaan reagen. Setiap reagen harus memiliki dokumentasi terkait nomor *batch*, tanggal pembukaan, kondisi penyimpanan, dan masa berlaku. Antibodi dan kromogen perlu diuji secara berkala untuk memastikan stabilitas performanya. Pencatatan yang sistematis memungkinkan pelacakan sumber masalah apabila terjadi penurunan kualitas pewarnaan.

Validasi *batch* merupakan bagian integral dari sistem kendali mutu. Setiap kali *batch* reagen baru digunakan terutama antibodi primer atau kit deteksi diperlukan uji validasi dengan menggunakan jaringan kontrol yang telah terkarakterisasi dengan baik. Tujuan validasi ini adalah memastikan bahwa *batch* baru menghasilkan pola pewarnaan yang konsisten dengan batch sebelumnya. Perbandingan

dilakukan terhadap intensitas sinyal, distribusi pewarnaan, dan tingkat background.

Proses validasi *batch* biasanya melibatkan evaluasi kuantitatif atau semi-kuantitatif oleh pengamat yang terlatih. Dalam beberapa laboratorium, sistem pencitraan digital digunakan untuk mendukung penilaian objektif terhadap intensitas pewarnaan. Apabila ditemukan perbedaan signifikan antar batch, diperlukan penyesuaian parameter protokol atau penggantian reagen.

Implementasi SOP juga menuntut pelatihan operator secara berkala. Kompetensi teknisi laboratorium dalam mengikuti prosedur standar sangat menentukan keberhasilan reproduksibilitas hasil. Audit internal dan evaluasi rutin membantu memastikan bahwa SOP dijalankan secara konsisten dan diperbarui sesuai perkembangan teknologi. Dengan penerapan SOP yang komprehensif dan sistem validasi batch yang ketat, laboratorium dapat mempertahankan kualitas analisis IHK secara berkelanjutan. Pendekatan ini mendukung integritas ilmiah, keandalan diagnostik, dan akuntabilitas dokumentasi laboratorium.

3. *Inter-laboratory Reproducibility* dan Standarisasi

Reproduksibilitas antar laboratorium (*inter-laboratory reproducibility*) merupakan aspek penting dalam IHK karena hasil pewarnaan harus dapat diperoleh secara konsisten meskipun dilakukan di fasilitas yang berbeda. Variasi antar laboratorium dapat muncul akibat perbedaan dalam teknik preparasi jaringan, jenis reagen, peralatan, serta

pengalaman operator. Tanpa standarisasi yang memadai, interpretasi hasil IHK dapat menjadi tidak seragam dan berpotensi menimbulkan perbedaan kesimpulan diagnostik.

Salah satu sumber variasi utama adalah tahap pra-analitik, yang meliputi metode pengambilan sampel, jenis fiksatif, dan durasi fiksasi. Perbedaan kecil dalam kondisi ini dapat memengaruhi stabilitas antigen dan kualitas pewarnaan. Oleh karena itu, standarisasi prosedur pra-analitik menjadi fondasi penting untuk meningkatkan keseragaman hasil antar laboratorium.

Pada tahap analitik, perbedaan dalam pilihan antibodi, sistem deteksi, serta parameter antigen retrieval juga berkontribusi terhadap variasi hasil. Untuk mengurangi perbedaan ini, diperlukan penggunaan protokol yang tervalidasi secara luas dan referensi antibodi yang telah diuji performanya pada berbagai pusat laboratorium. Penggunaan bahan kontrol yang terstandarisasi memungkinkan perbandingan hasil secara objektif.

Upaya dalam melakukan standarisasi sering dilakukan melalui program uji profisiensi eksternal (*external quality assessment/EQA*), di mana beberapa laboratorium menganalisis sampel yang sama dan membandingkan hasilnya. Program ini membantu mengidentifikasi variasi prosedural dan meningkatkan harmonisasi metode. Selain itu, penggunaan pedoman internasional dan rekomendasi organisasi profesional mendukung penyelarasan praktik IHK.

Digitalisasi dan sistem pencitraan terstandarisasi juga berperan penting dalam meningkatkan reproduksibilitas.

Analisis citra berbasis perangkat lunak memungkinkan kuantifikasi sinyal secara objektif dan mengurangi subjektivitas pengamat. Standarisasi format penyimpanan data dan parameter analisis memudahkan pertukaran informasi antar institusi.

Penerapan sistem manajemen mutu laboratorium, termasuk dokumentasi yang lengkap dan audit berkala, mendukung konsistensi operasional. Pelatihan operator dan sertifikasi kompetensi turut berkontribusi terhadap keseragaman teknik. Dengan kombinasi standarisasi prosedural, kontrol mutu eksternal, dan integrasi teknologi digital, reproduksibilitas antar laboratorium dapat ditingkatkan secara signifikan. *Inter-laboratory reproducibility* yang baik tidak hanya meningkatkan keahlian diagnostik, tetapi juga memperkuat validitas penelitian. Keseragaman metode memungkinkan data dibandingkan secara langsung dan mempercepat perkembangan ilmu pengetahuan berbasis *biomarker*.

4. Etika, Keselamatan, dan Pengelolaan Sampel

Pelaksanaan pemeriksaan IHK tidak hanya menuntut ketepatan teknis, tetapi juga harus memenuhi prinsip etika penelitian, keselamatan kerja laboratorium, dan pengelolaan sampel biologis yang bertanggung jawab. Ketiga aspek ini saling berkaitan dan menjadi fondasi penting dalam praktik laboratorium modern.

Dari sisi etika, penggunaan sampel jaringan manusia harus mengikuti prinsip etik terhadap hak pasien dan kerahasiaan data.

Setiap penggunaan jaringan untuk tujuan diagnostik atau penelitian harus didasarkan pada persetujuan yang sah serta mengikuti regulasi institusional dan pedoman komite etik. Identitas pasien harus dilindungi melalui sistem kode atau anonimisasi untuk mencegah penyalahgunaan informasi. Pengelolaan data hasil pemeriksaan juga harus dilakukan secara transparan dan dapat dipertanggungjawabkan.

Aspek keselamatan kerja menjadi perhatian utama karena prosedur IHK melibatkan bahan kimia berbahaya dan sampel biologis yang berpotensi infeksius. Formalin, xilena, dan berbagai pelarut organik bersifat toksik dan memerlukan penanganan di ruang berventilasi baik atau lemari asam. Operator harus menggunakan alat pelindung diri, seperti sarung tangan, jas laboratorium, dan pelindung mata. Selain itu, semua sampel jaringan diperlakukan sebagai bahan biologis berisiko sehingga penerapan prinsip biosafety dan pembuangan limbah sesuai standar sangat diperlukan untuk mencegah paparan dan kontaminasi lingkungan.

Pengelolaan sampel mencakup seluruh siklus mulai dari penerimaan, pelabelan, penyimpanan, hingga arsip jangka panjang. Setiap spesimen harus diberi identifikasi yang jelas dan dapat ditelusuri untuk menghindari kesalahan administrasi. Kondisi penyimpanan blok parafin dan slide harus dikendalikan untuk menjaga stabilitas antigen dan kualitas morfologi jaringan. Sistem dokumentasi yang rapi memungkinkan pelacakan riwayat sampel dan mendukung audit mutu laboratorium. Integrasi prinsip etika, keselamatan,

dan manajemen sampel yang baik meningkatkan kepercayaan terhadap hasil pemeriksaan IHK. Lingkungan kerja yang aman dan terorganisasi tidak hanya melindungi personel laboratorium, tetapi juga menjamin integritas ilmiah dan kualitas layanan diagnostik.

PERTANYAAN:

1. Mengapa reproduksibilitas menjadi aspek yang sangat krusial dalam pemeriksaan IHK, dan faktor-faktor apa saja yang dapat memengaruhi konsistensi hasil baik dalam satu laboratorium maupun antar laboratorium?
2. Bagaimana pendekatan *troubleshooting* yang sistematis dapat membantu meningkatkan kualitas pewarnaan IHK, serta komponen proses apa saja yang harus dievaluasi ketika terjadi masalah teknis?
3. Jelaskan peran *Standard Operating Procedures* (SOP), validasi *batch*, serta program uji profisiensi eksternal dalam menjamin mutu, standarisasi, dan akuntabilitas pemeriksaan IHK di laboratorium diagnostik.

RINGKASAN:

Keberhasilan IHK tidak hanya ditentukan oleh protokol teknis, tetapi juga oleh kemampuan melakukan *troubleshooting*, menjaga reproduksibilitas hasil, dan melakukan dokumentasi laboratorium yang baik. Reproduksiabilitas sangat penting karena hasil IHK digunakan untuk diagnosis dan penelitian *biomarker*.

Masalah teknis yang sering muncul meliputi pewarnaan lemah, *background tinggi*, pewarnaan tidak merata, dan artefak jaringan. Penyebabnya dapat berasal dari antigen retrieval yang tidak optimal, konsentrasi antibodi yang tidak sesuai, blokade yang kurang efektif, atau kesalahan preparasi jaringan. Pendekatan *troubleshooting* dilakukan secara sistematis dengan mengevaluasi kualitas jaringan, kondisi reagen, dan ketepatan prosedur untuk menemukan sumber kesalahan dan memperbaiki kualitas pewarnaan.

Konsistensi hasil dijaga melalui penerapan *standard operating procedures* (SOP) yang mengatur seluruh tahapan kerja, mulai dari preparasi jaringan hingga interpretasi hasil. SOP harus mencakup parameter teknis yang jelas serta sistem pencatatan reagen dan nomor batch. Setiap penggunaan batch reagen baru perlu divalidasi menggunakan jaringan kontrol untuk memastikan hasil pewarnaan tetap konsisten. Pelatihan operator dan audit rutin juga diperlukan untuk menjaga kualitas kerja laboratorium.

Reproduksibilitas antar laboratorium memerlukan standarisasi prosedur pra-analitik dan analitik, penggunaan antibodi yang tervalidasi,

serta bahan kontrol yang seragam. Program uji profisiensi eksternal dan penggunaan sistem pencitraan digital membantu meningkatkan keseragaman hasil dan mengurangi subjektivitas interpretasi.

Pelaksanaan IHK juga harus memenuhi prinsip etika, keselamatan kerja, dan pengelolaan sampel biologis. Penggunaan jaringan manusia harus mengikuti persetujuan etik dan menjaga kerahasiaan pasien. Prosedur kerja harus memperhatikan keselamatan operator melalui penggunaan alat pelindung diri dan penanganan bahan kimia berbahaya secara benar. Selain itu, sistem pelabelan, penyimpanan, dan dokumentasi sampel yang baik diperlukan untuk menjamin ketertelusuran dan kualitas hasil pemeriksaan.

Secara keseluruhan, penerapan *troubleshooting* yang sistematis, SOP yang terstandarisasi, kontrol mutu yang ketat, serta pengelolaan sampel yang bertanggung jawab merupakan kunci untuk menghasilkan pemeriksaan IHK yang akurat, konsisten, dan dapat dipercaya.

BAB II

***Marker* IHK Kunci pada Tumor Oral**

TUJUAN PEMBELAJARAN :

Mahasiswa memahami konsep dasar serta peran *marker* IHK pada tumor oral, sehingga mampu menguasai landasan teoretis mengenai ekspresi *biomarker* molekuler yang berhubungan dengan proliferasi sel, apoptosis, diferensiasi sel, dan progresivitas tumor. Mahasiswa diharapkan mampu memahami penggunaan teknik IHK sebagai metode deteksi *biomarker* untuk menunjang diagnosis, penentuan prognosis, dan evaluasi terapi pada tumor rongga mulut.

CAPAIAN PEMBELAJARAN:

Mahasiswa mampu menjelaskan berbagai *marker* IHK kunci pada tumor oral beserta fungsi biologisnya, sehingga dapat memahami peran *biomarker* molekuler dalam proses karsinogenesis dan perkembangan tumor. Mahasiswa juga mampu menginterpretasikan hasil pemeriksaan IHK secara sederhana sebagai dasar dalam menunjang diagnosis dan penilaian karakteristik tumor rongga mulut.

A. *Marker* Epitelial dan Diferensiasi

Tumor rongga mulut menunjukkan spektrum morfologi dan perilaku biologis yang luas, sehingga identifikasi *biomarker* IHK menjadi komponen penting dalam diagnosis, klasifikasi, dan penilaian prognosis. *Marker*

IHK memungkinkan karakterisasi asal sel tumor, derajat diferensiasi, serta potensi agresivitas biologisnya. Dalam konteks patologi oral, *marker* epitelial dan diferensiasi memiliki peran sentral karena sebagian besar tumor rongga mulut berasal dari epitel skuamosa.

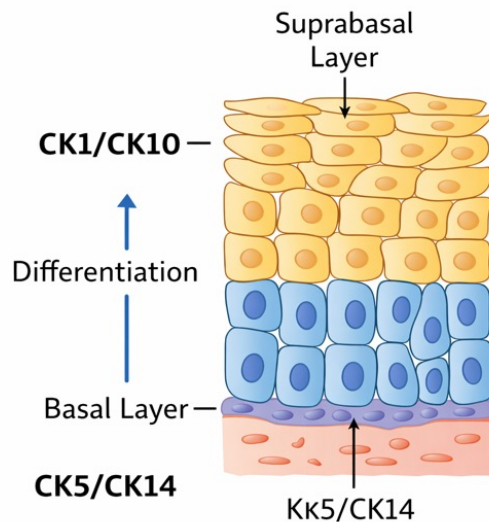
Marker epitelial digunakan untuk mengidentifikasi asal jaringan tumor serta menilai tingkat diferensiasi sel. Ekspresi protein struktural dan regulator diferensiasi epitel memberikan informasi penting mengenai status biologis tumor. Pada tumor oral, terutama karsinoma sel skuamosa, pola ekspresi *marker* epitelial sering berkorelasi dengan tingkat maturasi sel dan perilaku invasif.

1. Keluarga Sitokeratin (CK): Subtipe dan Implikasi Klinis

Sitokeratin (CK) merupakan kelompok protein filamen intermediat yang membentuk kerangka struktural utama sel epitel. Protein ini tidak hanya berfungsi sebagai penopang mekanik sel, tetapi juga berperan dalam regulasi proliferasi, diferensiasi, dan respons terhadap stres seluler. Setiap jenis epitel memiliki pola ekspresi sitokeratin yang khas, sehingga profil sitokeratin menjadi alat penting dalam identifikasi asal jaringan tumor melalui IHK. Secara molekuler, sitokeratin diklasifikasikan menjadi dua kelompok besar, yaitu sitokeratin tipe I (asam) dan tipe II (basa atau netral). Kedua tipe ini membentuk pasangan heterodimer yang kemudian tersusun menjadi jaringan filamen intermediat. Kombinasi pasangan sitokeratin mencerminkan status diferensiasi sel epitel. Pada epitel skuamosa rongga mulut normal, sel basal mengekspresikan CK5 dan CK14 yang berkaitan dengan aktifitas proliferasi. Seiring proses maturasi ke

lapisan suprabasal, terjadi peralihan ekspresi menuju CK1 dan CK10 yang berhubungan dengan diferensiasi terminal dan keratinisasi.

Dalam proses transformasi neoplastik, pola ekspresi sitokeratin sering mengalami perubahan yang mencerminkan gangguan regulasi diferensiasi epitel. Pada karsinoma sel skuamosa oral berdiferensiasi baik, ekspresi CK5/6 umumnya masih dipertahankan, menunjukkan asal skuamosa tumor. Namun pada tumor dengan derajat diferensiasi rendah, dapat muncul ekspresi sitokeratin yang biasanya ditemukan pada epitel sederhana, seperti CK8 dan CK18. Fenomena ini mencerminkan dediferensiasi dan plasticitas fenotip sel tumor, yang sering dikaitkan dengan peningkatan kemampuan invasi dan metastasis.



Gambar 7. Skema epitel skuamosa berlapis yang menunjukkan ekspresi sitokeratin spesifik lapisan. Lapisan basal mengekspresikan sitokeratin CK5 dan CK14 yang berasosiasi dengan sel epitel proliferasi. Seiring migrasi sel ke arah permukaan dan proses diferensiasi, lapisan suprabasal

mengekspresikan CK1 dan CK10 sebagai penanda maturasi epitel. Panah menunjukkan diferensiasi sel dari lapisan basal ke lapisan suprabasal.

Selain sebagai penanda asal epitel, profil sitokeratin memiliki nilai diagnostik dalam membedakan tumor primer dari metastasis. Panel CK7 dan CK20 sering digunakan untuk membantu menentukan kemungkinan sumber tumor sekunder yang melibatkan rongga mulut. Kombinasi ekspresi CK juga dapat membantu membedakan lesi reaktif dari neoplasma ganas, serta mengidentifikasi varian histologis tertentu dari karsinoma sel skuamosa. Dari sudut pandang klinis, perubahan ekspresi sitokeratin berkaitan dengan perilaku biologis tumor. Hilangnya pola ekspresi yang terorganisasi sering mencerminkan instabilitas seluler dan berkorelasi dengan prognosis yang lebih buruk. Oleh karena itu, analisis sitokeratin tidak hanya berfungsi sebagai alat klasifikasi diagnostik, tetapi juga memberikan informasi mengenai tingkat agresivitas tumor.

2. **p63, p40 dan *Marker Stemness* pada Epitel**

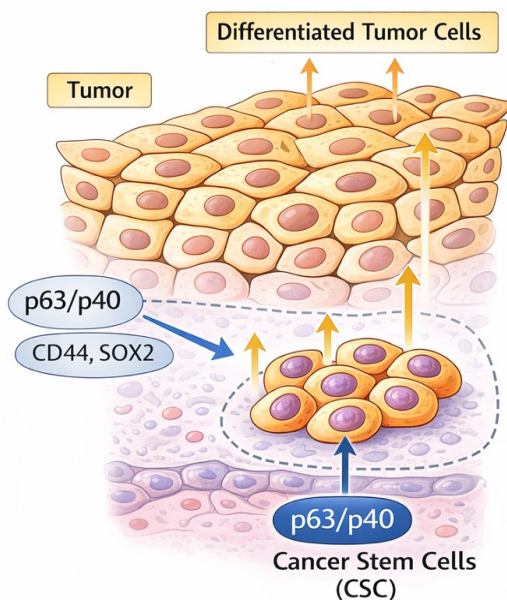
Protein p63 merupakan anggota keluarga faktor transkripsi p53 yang berperan penting dalam perkembangan dan pemeliharaan epitel skuamosa. Dalam konteks IHC, p63 digunakan sebagai penanda sel basal epitel karena ekspresinya yang dominan pada kompartemen proliferasi. Secara molekuler, protein p63 dikodekan oleh gen TP63, yang menghasilkan beberapa isoform melalui mekanisme promoter alternatif dan splicing.

Dua kelompok isoform utama adalah TAp63 dan Δ Np63, yang memiliki fungsi biologis berbeda. Isoform Δ Np63 merupakan bentuk yang paling banyak diekspresikan pada epitel skuamosa

dan berperan dalam mempertahankan populasi sel progenitor dengan mengatur keseimbangan antara proliferasi dan diferensiasi. Pada epitel skuamosa rongga mulut normal, p63 diekspresikan terutama pada lapisan basal, yaitu kompartemen sel yang memiliki kapasitas proliferasi tinggi. Ekspresi ini mencerminkan fungsi p63 dalam mempertahankan sifat "*stem-like*" sel basal dan mendukung regenerasi epitel. Dalam konteks tumor, khususnya karsinoma sel skuamosa oral (OSCC), ekspresi p63 sering meningkat dan berkorelasi dengan aktivitas proliferasi serta gangguan diferensiasi epitel. Isoform spesifik p63 yang dikenal sebagai p40 (Δ Np63) memiliki nilai diagnostik yang sangat penting. Antibodi p40 dirancang untuk mengenali isoform Δ Np63 secara selektif, sehingga memberikan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan antibodi p63 konvensional yang mendeteksi semua isoform. Dalam praktik IHK, p40 menjadi *marker* andalan untuk mengonfirmasi diferensiasi skuamosa dan membantu membedakan karsinoma sel skuamosa dari adenokarsinoma, tumor saluran saliva, atau neoplasma non-epitelial.

Pola pewarnaan nuklear yang kuat dan terbatas pada kompartemen basal tumor mendukung interpretasi diagnostik yang akurat. Selain *marker* diferensiasi epitel, penelitian modern menyoroti pentingnya *marker stemness* yang berkaitan dengan keberadaan *cancer stem cells* (CSC). Sel CSC dianggap sebagai subpopulasi tumor dengan kemampuan *self-renewal*, diferensiasi multipotensial, serta resistensi terhadap kemoterapi dan radioterapi. *Marker* seperti SOX2, OCT4, NANOG, dan CD44 sering digunakan untuk mengidentifikasi populasi ini. Pada OSCC, peningkatan ekspresi *marker stemness* berkaitan dengan invasi lokal yang lebih agresif, potensi metastasis

yang lebih tinggi, resistensi terapi, dan risiko rekurensi tumor. Secara biologis, terdapat interaksi fungsional antara jalur p63 dan jaringan regulasi *stemness*. $\Delta Np63$ dapat mengatur ekspresi gen yang terlibat dalam pemeliharaan identitas sel basal dan berinteraksi dengan jalur sinyal seperti Wnt/ β -catenin, Notch, dan Hedgehog, yang semuanya berperan dalam pengendalian diferensiasi dan *stemness* sel tumor. Analisis kombinasi p63/p40 dengan *marker stemness* melalui IHK multiplex atau imunofluoresens memberikan wawasan mengenai hierarki diferensiasi sel tumor. Pendekatan ini memungkinkan identifikasi zona tumor dengan aktivitas progenitor tinggi dan membantu menjelaskan heterogenitas intratumoral. Dari sudut pandang klinis, profil ekspresi gabungan tersebut berpotensi menjadi indikator prognostik dan target terapi yang relevan dalam pengembangan strategi pengobatan presisi pada kanker oral.



Gambar 8. Skema hierarki diferensiasi sel tumor epitel skuamosa dan

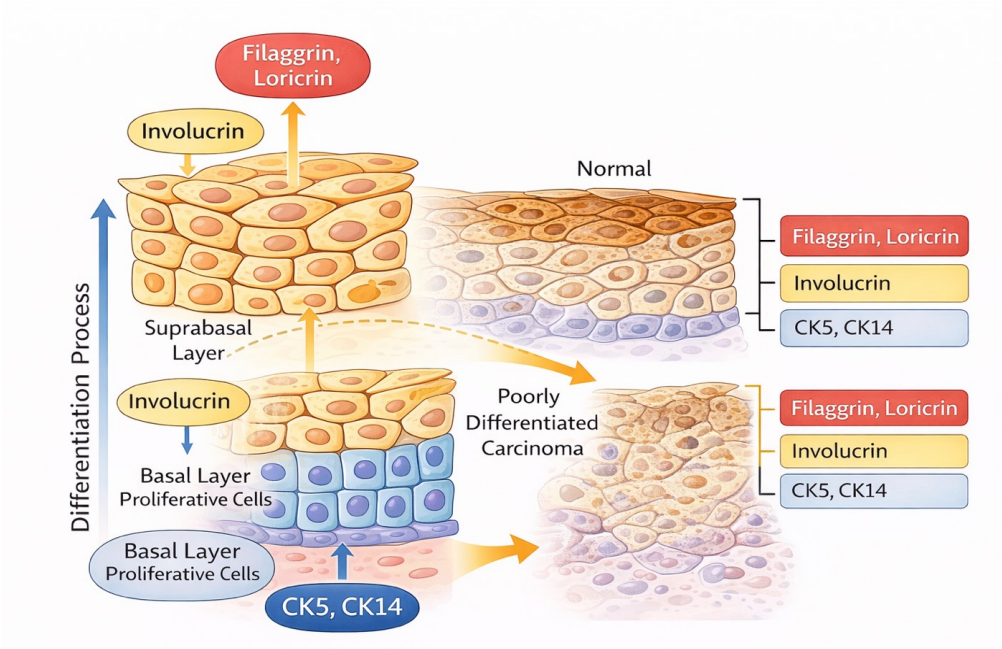
peran *marker* p63/p40 serta *marker stemness*. Ilustrasi menunjukkan organisasi sel tumor dari kompartemen sel basal hingga sel tumor yang lebih berdiferensiasi. Sel dengan sifat *cancer stem cells* (CSC) ditandai dengan ekspresi p63/p40 serta *marker stemness* seperti CD44 dan SOX2, yang berperan dalam kapasitas proliferasi dan *self-renewal*. Panah menunjukkan arah diferensiasi sel menuju populasi sel tumor yang lebih matur.

3. *Marker Diferensiasi Korneal dan Keratinisasi*

Keratinisasi merupakan proses diferensiasi terminal yang menjadi ciri khas epitel skuamosa matang. Pada epitel rongga mulut, proses ini melibatkan transformasi bertahap sel basal proliferaatif menjadi sel superfisial yang mengalami kornifikasi. Dalam konteks IHK, *marker* diferensiasi korneal digunakan untuk mengevaluasi tingkat maturasi epitel dan membantu menilai derajat diferensiasi tumor epitelial. Selama proses keratinisasi, sel epitel mengalami perubahan struktural dan biokimia yang kompleks, termasuk reorganisasi sitoskeleton keratin, pembentukan envelope korneosit, serta akumulasi protein struktural spesifik. Protein seperti involucrin, filaggrin, dan loricrin merupakan komponen utama envelope korneosit yang berfungsi memperkuat stabilitas mekanik dan ketahanan terhadap stres lingkungan. Ekspresi protein-protein ini pada jaringan normal umumnya terbatas pada lapisan suprabasal dan superfisial, mencerminkan tahap maturasi terminal sel epitel.

Dalam karsinoma sel skuamosa rongga mulut, pola ekspresi *marker* keratinisasi sering mengalami perubahan yang berkaitan erat dengan tingkat diferensiasi histologis tumor. Tumor yang

berdiferensiasi baik cenderung mempertahankan ekspresi *marker* diferensiasi korneal dengan distribusi yang relatif terorganisasi, sering kali disertai pembentukan mutiara keratin (*keratin pearls*). Sebaliknya, pada tumor berdiferensiasi sedang hingga buruk, ekspresi marker ini dapat berkurang, terfragmentasi, atau bahkan hilang sama sekali, mencerminkan gangguan program diferensiasi epitel. Evaluasi IHK *marker* keratinisasi memberikan informasi tambahan dalam klasifikasi histopatologis tumor. Pola ekspresi yang menurun sering berkorelasi dengan peningkatan aktivitas proliferasi, instabilitas genetik, dan fenotip sel yang lebih anaplastik. Dengan demikian, analisis *marker* diferensiasi tidak hanya membantu dalam penentuan derajat diferensiasi tumor, tetapi juga memberikan gambaran mengenai perilaku biologisnya.



Gambar 9. Skema diferensiasi epitel skuamosa dan perubahan

ekspresi *marker* keratinisasi pada jaringan normal dan karsinoma berdiferensiasi buruk.

Ilustrasi pada **Gambar 9** menunjukkan gradasi diferensiasi epitel skuamosa dari lapisan basal proliferasif yang mengekspresikan CK5/CK14 menuju lapisan suprabasal dan superfisial yang mengekspresikan *marker* keratinisasi seperti involucrin, filaggrin, dan loricrin. Pada jaringan normal, ekspresi *marker* mengikuti pola yang terorganisasi sesuai tahap maturasi sel. Pada karsinoma berdiferensiasi buruk, arsitektur epitel menjadi tidak teratur disertai penurunan dan disorganisasi ekspresi *marker* diferensiasi.

Selain perannya dalam maturasi epitel, protein terkait keratinisasi juga berpartisipasi dalam respons terhadap stres seluler dan interaksi dengan mikro-lingkungan tumor. Perubahan ekspresi protein *envelope* korneosit dapat mencerminkan adaptasi sel tumor terhadap hipoksia, inflamasi kronis, dan tekanan mekanik jaringan. Variasi ini berkontribusi terhadap heterogenitas intratumoral dan dapat memengaruhi invasi lokal serta respons terhadap terapi. Dalam praktik diagnostik, interpretasi *marker* diferensiasi korneal sebaiknya dilakukan bersamaan dengan *marker* proliferasi dan *marker* epitel basal. Pendekatan kombinatorial ini memungkinkan penilaian yang lebih komprehensif terhadap spektrum diferensiasi tumor, dari populasi sel progenitor hingga kompartemen sel yang mengalami maturasi terminal.

4. ***Epithelial Membrane Antigen (EMA)*** dan **Marker Lainnya**

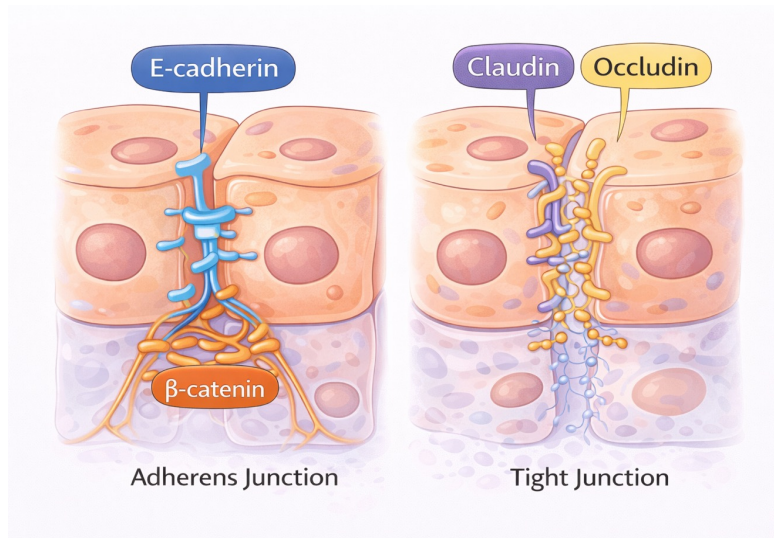
Epithelial Membrane Antigen (EMA), yang juga dikenal sebagai MUC1, merupakan glikoprotein transmembran yang diekspresikan secara luas pada permukaan sel epitel. Protein ini berperan dalam perlindungan permukaan sel, adhesi antar sel, serta transmisi sinyal intraseluler. Dalam jaringan epitel normal rongga mulut, ekspresi EMA terutama terlihat pada permukaan luminal dan membran sel lapisan suprabasal, mencerminkan fungsi barier dan sekresi epitel.

Pada pemeriksaan IHK, EMA digunakan sebagai *marker* diferensiasi epitel yang membantu mengkonfirmasi asal epitelial suatu neoplasma. Pola pewarnaan EMA umumnya bersifat *membranous* atau sitoplasmik granular, tergantung pada jenis jaringan dan kondisi patologis. Dalam *tumor epitelial*, termasuk karsinoma sel skuamosa rongga mulut, ekspresi EMA sering mengalami perubahan baik dalam intensitas maupun distribusi. Peningkatan ekspresi atau redistribusi EMA dapat mencerminkan gangguan polaritas sel dan perubahan interaksi antar sel yang berkaitan dengan transformasi neoplastik. Selain sebagai *marker* diagnostik, EMA memiliki implikasi biologis yang penting. Overekspresi MUC1 pada sel tumor berhubungan dengan peningkatan motilitas sel, resistensi terhadap apoptosis, dan kemampuan invasi. Domain sitoplasmik EMA dapat berinteraksi dengan berbagai jalur sinyal intraseluler yang terlibat dalam proliferasi dan kelangsungan hidup sel. Oleh karena itu, ekspresi EMA tidak hanya mencerminkan diferensiasi epitel, tetapi juga berkaitan dengan dinamika progresi tumor.

Dalam praktik diagnostik kedokteran gigi, EMA sering

digunakan sebagai bagian dari panel IHK untuk membedakan tumor epitelial dari lesi mesenkimal atau limfoid. *Marker* ini juga membantu dalam evaluasi tumor kelenjar saliva dan lesi odontogenik yang memiliki komponen epitel. Interpretasi hasil EMA sebaiknya mempertimbangkan konteks morfologi histologis dan dikombinasikan dengan *marker* epitel lain seperti sitokeratin dan p63 untuk meningkatkan akurasi diagnostik. Selain EMA, beberapa *marker* epitel tambahan sering digunakan untuk melengkapi karakterisasi tumor oral. *Marker* adhesi sel seperti E-cadherin berperan dalam mempertahankan kohesi epitel dan sering menunjukkan penurunan ekspresi pada tumor invasif. Protein kompleks perlekatan seperti β -catenin tidak hanya berfungsi struktural tetapi juga terlibat dalam jalur sinyal Wnt yang memengaruhi proliferasi sel.

Marker lain seperti claudin dan occludin, yang merupakan komponen *tight junction*, memberikan informasi mengenai integritas barier epitel. Perubahan ekspresi *marker* tersebut mencerminkan reorganisasi mikroarsitektur epitel selama transformasi neoplastik. Kombinasi analisis EMA dengan *marker* adhesi dan *junctional proteins* memungkinkan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai status diferensiasi dan potensi invasif tumor. Pendekatan ini semakin penting dalam era patologi molekuler, di mana karakterisasi imunofenotipik berkontribusi terhadap stratifikasi risiko dan perencanaan terapi.



Gambar 10. Susunan *junction* antar sel pada epitel skuamosa berlapis.

Ilustrasi diatas menunjukkan susunan *junction* antar sel pada epitel skuamosa, yang terdiri atas *tight junction* di bagian apikal dan *adherens junction* di bagian bawahnya. *Tight junction* dibentuk oleh protein seperti occludin dan claudin yang berperan sebagai barier selektif antar sel. *Adherens junction* dimediasi oleh kompleks E-cadherin dan β -catenin yang menghubungkan membran sel dengan sitoskeleton aktin. Kedua jenis *junction* ini bekerja bersama dalam mempertahankan integritas struktural dan fungsi barier epitel.

Epitel skuamosa berlapis mempertahankan keutuhan jaringan melalui susunan *junction* antar sel yang tersusun berlapis. Pada bagian paling apikal terdapat *tight junction* yang berfungsi sebagai segel antar sel dan mengatur perpindahan zat melalui ruang antar sel. Struktur ini terutama dibentuk oleh protein occludin dan claudin yang menciptakan barier rapat untuk menjaga stabilitas lingkungan jaringan. Pada bagian

bawah terdapat *adherens junction* yang berperan dalam menjaga perlekatan mekanik antar sel. *Junction* ini dimediasi oleh interaksi E-cadherin pada membran sel yang berdekatan, dengan β -catenin sebagai penghubung ke rangka aktin di dalam sel. Kompleks ini tidak hanya memperkuat kohesi jaringan, tetapi juga terlibat dalam pengaturan sinyal seluler yang memengaruhi proliferasi dan diferensiasi epitel.

Gangguan pada susunan *junction* antar sel merupakan salah satu ciri penting transformasi neoplastik. Penurunan ekspresi E-cadherin atau perubahan distribusi β -catenin dapat melemahkan perlekatan sel dan meningkatkan kemampuan invasi tumor. Demikian pula, kerusakan *tight junction* dapat mengganggu fungsi pelindung epitel. Oleh karena itu, pemeriksaan IHK terhadap protein junctional memberikan informasi penting mengenai status diferensiasi dan perilaku biologis tumor epitel.

5. Perubahan Ekspresi *Marker* Molekuler dalam Progresi Displasia Menuju Karsinoma

Progresi dari epitel normal menuju displasia dan akhirnya menjadi karsinoma merupakan proses bertahap yang melibatkan akumulasi perubahan genetik dan epigenetik. Perubahan tersebut tidak hanya tercermin pada gambaran morfologis sel, tetapi juga pada pola ekspresi berbagai *marker* molekuler yang dapat dideteksi melalui pemeriksaan IHK maupun teknik molekuler lainnya. Oleh karena itu, pemahaman mengenai perubahan ekspresi *marker* selama proses displasia hingga transformasi ganas memiliki peranan penting dalam diagnosis,

penentuan prognosis, serta evaluasi risiko progresi lesi prakanker.

Pada epitel normal, proliferasi sel terbatas pada lapisan basal dan parabasal. Ekspresi *marker* proliferasi seperti Ki-67 umumnya hanya ditemukan pada sel-sel di lapisan basal, mencerminkan aktivitas mitosis yang terkontrol. Seiring terjadinya displasia, terutama displasia derajat sedang hingga berat, ekspresi Ki-67 meluas ke lapisan suprabasal. Ekspansi zona proliferasi ini menunjukkan hilangnya kontrol siklus sel dan merupakan salah satu indikator awal transformasi neoplastik.

Selain peningkatan aktivitas proliferasi, terjadi pula perubahan pada protein pengatur siklus sel. Protein p53, yang dalam kondisi normal berfungsi sebagai “penjaga genom” (*guardian of the genome*), mengalami mutasi atau akumulasi abnormal pada banyak kasus displasia berat dan karsinoma. Pada jaringan normal, ekspresi p53 biasanya rendah dan sulit terdeteksi. Namun, pada lesi displastik dan karsinoma, protein p53 sering menunjukkan overekspresi akibat stabilisasi bentuk mutan yang tidak dapat didegradasi secara normal. Pola pewarnaan IHK yang kuat dan difus sering dikaitkan dengan mutasi gen TP53 dan berkorelasi dengan progresi keganasan.

Perubahan juga terjadi pada regulasi siklus sel melalui jalur p16INK4a–CDK4/6–Rb. Pada kondisi tertentu, seperti infeksi *human papillomavirus* (HPV) risiko tinggi, inaktivasi protein Rb oleh onkoprotein virus menyebabkan overekspresi kompensatorik p16. Oleh karena itu, peningkatan ekspresi p16 dapat menjadi indikator adanya gangguan pada jalur kontrol siklus sel dan sering digunakan sebagai *marker surrogate* pada lesi intraepitelial yang berpotensi menjadi karsinoma, terutama pada mukosa orofaring

dan serviks. Pada karsinoma invasif, ekspresi p16 dapat tetap tinggi, terutama pada kasus yang berhubungan dengan HPV.

Marker adhesi sel juga mengalami perubahan signifikan selama progresi keganasan. E-cadherin, yang berperan dalam mempertahankan adhesi antar sel epitel, umumnya diekspresikan kuat dan homogen pada epitel normal. Pada displasia berat dan karsinoma, terjadi penurunan atau hilangnya ekspresi E-cadherin, yang berkontribusi terhadap berkurangnya kohesi sel dan meningkatnya kemampuan invasi. Hilangnya E-cadherin sering disertai dengan peningkatan ekspresi N-cadherin, suatu fenomena yang dikenal sebagai *epithelial-mesenchymal transition* (EMT). Proses EMT memungkinkan sel epitel memperoleh sifat mesenkimal, termasuk peningkatan motilitas dan kapasitas invasif.

Dalam konteks proliferasi dan pertumbuhan, ekspresi reseptor faktor pertumbuhan seperti *epidermal growth factor receptor* (EGFR) juga cenderung meningkat pada displasia derajat tinggi dan karsinoma. Overekspresi EGFR berkaitan dengan aktivasi jalur sinyal proliferasi yang berlebihan, seperti jalur MAPK dan PI3K/AKT, yang mendorong pertumbuhan sel yang tidak terkendali serta resistensi terhadap apoptosis (Rahaju, 2020). Secara klinis, peningkatan ekspresi EGFR sering dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk dan menjadi target terapi pada beberapa jenis karsinoma. Angiogenesis merupakan tahapan penting dalam progresi dari lesi prakanker menuju karsinoma invasif. *Marker* angiogenik seperti *vascular endothelial growth factor* (VEGF) menunjukkan peningkatan ekspresi seiring bertambahnya derajat displasia. Pada karsinoma invasif, ekspresi VEGF yang tinggi sering dikaitkan dengan

peningkatan aktivitas angiogenesis, laju pertumbuhan tumor yang lebih cepat, invasi yang lebih agresif, serta risiko metastasis yang lebih besar (Rahaju, 2021). Peningkatan densitas mikrovaskular sering berkorelasi dengan agresivitas tumor dan risiko metastasis.

Marker apoptosis juga mengalami perubahan. Protein antiapoptotik seperti Bcl-2 dapat menunjukkan ekspresi yang meningkat pada tahap awal displasia, memungkinkan sel dengan kerusakan DNA bertahan lebih lama dari yang seharusnya. Sebaliknya, aktivasi caspase sebagai mediator apoptosis sering mengalami penurunan fungsi pada karsinoma, sehingga mekanisme eliminasi sel abnormal menjadi terganggu. Ketidakseimbangan antara proliferasi dan apoptosis ini menjadi salah satu ciri utama transformasi ganas. Perubahan pada *marker* diferensiasi epitel turut mencerminkan progresi lesi. Pada epitel skuamosa normal, ekspresi sitokeratin mengikuti pola yang teratur sesuai dengan tingkat maturasi sel.

Pada displasia, pola ekspresi sitokeratin menjadi tidak teratur, dan pada karsinoma invasif sering ditemukan ekspresi sitokeratin yang abnormal atau tidak sesuai dengan pola diferensiasi normal. Derajat diferensiasi histologis karsinoma sering kali berkorelasi dengan perubahan ekspresi *marker* sitokeratin tertentu. Secara keseluruhan, progresi dari displasia menuju karsinoma ditandai oleh kombinasi peningkatan *marker* proliferasi, gangguan protein pengatur siklus sel, perubahan adhesi sel, aktivasi jalur pertumbuhan, peningkatan angiogenesis, serta gangguan mekanisme apoptosis. Tidak ada satu marker tunggal yang sepenuhnya menentukan transformasi ganas; interpretasi harus dilakukan secara integratif dengan mempertimbangkan gambaran histopatologis dan konteks klinis.

Pemahaman mengenai dinamika perubahan ekspresi marker ini memberikan dasar ilmiah yang kuat bagi mahasiswa kedokteran gigi dalam menilai lesi prakanker rongga mulut. Dengan pendekatan yang komprehensif, deteksi dini dan penatalaksanaan lesi displastik dapat dilakukan lebih tepat, sehingga mencegah progresi menjadi karsinoma invasif yang memiliki morbiditas dan mortalitas lebih tinggi.

PERTANYAAN:

1. Bagaimana perbedaan ekspresi sub tipe sitokeratin (CK) dapat digunakan untuk mengidentifikasi asal jaringan epitel dan membantu penegakan diagnosis pada lesi epitelial?
2. Apa peran p63 dan p40 sebagai *marker stemness* epitel dalam proses diferensiasi dan bagaimana signifikansinya dalam membedakan lesi epitel jinak dan ganas?
3. Bagaimana hubungan antara marker diferensiasi korneal, keratinisasi, dan ekspresi EMA dalam mencerminkan tingkat maturasi serta karakter biologis sel epitel?

RINGKASAN:

Tumor rongga mulut memiliki variasi morfologi dan perilaku biologis yang luas sehingga pemeriksaan IHC berperan penting dalam diagnosis, klasifikasi, dan penilaian prognosis. *Marker* IHC memungkinkan identifikasi asal sel tumor, derajat diferensiasi, serta potensi agresivitas biologisnya. Sebagian besar tumor rongga mulut berasal dari epitel skuamosa, sehingga *marker* epitelial dan diferensiasi menjadi komponen utama dalam evaluasi tumor oral. Sitokeratin (CK) merupakan *marker* epitelial utama yang digunakan untuk menentukan asal jaringan tumor dan tingkat diferensiasi sel.

Pola ekspresi CK mencerminkan status maturasi epitel, di mana sel basal normal mengekspresikan CK5 dan CK14, sedangkan sel suprabasal mengekspresikan CK1 dan CK10. Pada karsinoma sel skuamosa oral, perubahan pola ekspresi sitokeratin mencerminkan gangguan diferensiasi dan sering berkaitan dengan peningkatan agresivitas tumor. Panel CK juga membantu membedakan tumor primer dari metastasis serta lesi jinak dari lesi ganas.

Marker p63 dan p40 digunakan untuk mengidentifikasi diferensiasi skuamosa dan populasi sel basal yang memiliki sifat proliferasi tinggi. Protein p63 berperan dalam mempertahankan sel progenitor epitel, sedangkan p40 merupakan isoform yang lebih spesifik untuk diferensiasi skuamosa. Ekspresi *marker* ini meningkat pada karsinoma sel skuamosa oral dan membantu membedakan tumor epitelial dari neoplasma lain. Selain itu, *marker stemness* seperti SOX2, OCT4, NANOG, dan CD44 menunjukkan keberadaan *cancer stem cells* yang berkaitan

dengan agresivitas tumor, resistensi terapi, dan risiko kekambuhan. *Marker* diferensiasi keratinisasi, seperti involucrin, filaggrin, dan loricrin, mencerminkan proses maturasi terminal epitel skuamosa. Ekspresi marker ini biasanya teratur pada epitel normal dan tumor berdiferensiasi baik, tetapi menurun atau hilang pada tumor berdiferensiasi buruk. Oleh karena itu, marker keratinisasi membantu dalam penentuan derajat diferensiasi dan penilaian perilaku biologis tumor.

Epithelial Membrane Antigen (EMA) merupakan *marker* diferensiasi epitel yang membantu mengkonfirmasi asal epitelial suatu neoplasma. Perubahan ekspresi EMA pada tumor berkaitan dengan gangguan polaritas sel, peningkatan motilitas, dan kemampuan invasi. *Marker* tambahan seperti E-cadherin, β -catenin, claudin, dan occludin memberikan informasi mengenai integritas *junction* antar sel dan potensi invasif tumor. Penurunan ekspresi protein adhesi sel sering dikaitkan dengan peningkatan kemampuan invasi dan prognosis yang lebih buruk.

Secara keseluruhan, kombinasi berbagai marker IHC memberikan gambaran komprehensif mengenai asal sel, tingkat diferensiasi, dan karakter biologis tumor rongga mulut, sehingga sangat penting dalam menunjang diagnosis dan penentuan strategi terapi.

B. Marker Proliferasi, Siklus Sel, dan Apoptosis

Proliferasi sel, regulasi siklus sel, dan apoptosis merupakan aspek fundamental dalam patologi jaringan, terutama dalam konteks neoplasia. Perubahan pada mekanisme ini sering kali menjadi indikator awal transformasi sel normal menjadi sel abnormal atau kanker, sehingga memahami dinamika seluler ini menjadi sangat penting dalam evaluasi histopatologis. Analisis IHK terhadap *marker* spesifik memungkinkan penilaian kuantitatif dan kualitatif dari proses-proses ini. Dengan demikian, IHK tidak hanya membantu dalam diagnosis, tetapi juga memberikan informasi prognostik dan membantu pengambilan keputusan terapeutik. *Marker* proliferasi, regulator *checkpoint* siklus sel, dan protein apoptosis menjadi komponen utama dalam analisis ini karena keterkaitannya dengan pertumbuhan sel, mekanisme kontrol pertumbuhan, dan kematian sel terprogram.

1. Ki-67: Interpretasi Kuantitatif dan Klinis

Salah satu *marker* proliferasi yang paling banyak digunakan adalah Ki-67, sebuah protein nuklear yang diekspresikan pada semua fase aktif siklus sel, yaitu G1, S, G2, dan M, namun tidak ditemukan pada sel yang berada dalam fase istirahat (G0). Ki-67 berperan dalam organisasi kromatin, stabilitas genom, dan segregasi kromosom selama mitosis. Karena ekspresinya terbatas pada sel yang sedang membelah, Ki-67 menjadi indikator sensitif untuk menilai tingkat proliferasi sel dalam jaringan, terutama jaringan tumor (Sandra, 2001).

Dalam praktik IHK, Ki-67 dievaluasi melalui *labeling index* (LI), yang dihitung sebagai persentase sel yang menunjukkan pewarnaan nuklear positif dari total sel yang dianalisis (Sandra, 2001). Analisis

biasanya difokuskan pada *hotspot* area, yaitu area tumor dengan proliferasi tertinggi, untuk memastikan hasil yang representatif.

Secara kuantitatif, LI Ki-67 diklasifikasikan sebagai rendah, sedang, atau tinggi, dengan nilai *cut-off* yang dapat bervariasi tergantung jenis tumor dan literatur. Misalnya, LI <10% menunjukkan proliferasi rendah, LI 10–20% menunjukkan proliferasi sedang, dan LI >20–30% menunjukkan proliferasi tinggi. Dengan metode evaluasi yang lebih modern, penggunaan *software* analisis citra digital memungkinkan perhitungan yang lebih akurat dan *reproducible* dibandingkan evaluasi manual.

Secara klinis, Ki-67 memiliki relevansi yang signifikan. Tumor dengan ekspresi Ki-67 tinggi cenderung lebih agresif, memiliki risiko metastasis lebih tinggi, dan sering kali berhubungan dengan prognosis yang kurang menguntungkan (Satir, 2026). Dalam kanker payudara, misalnya, tumor dengan LI Ki-67 tinggi sering diklasifikasikan sebagai tumor proliferasi tinggi, yang mempengaruhi pilihan terapi adjuvan, termasuk kemoterapi dan terapi target. Dalam limfoma non-Hodgkin, penilaian Ki-67 membantu membedakan antara subtype agresif dan indolent, sehingga memengaruhi strategi pengobatan. Pada tumor otak seperti glioma, proliferasi tinggi yang ditunjukkan oleh Ki-67 mengindikasikan risiko progresi tumor yang lebih cepat dibandingkan tumor dengan LI rendah.

Selain memberikan informasi mengenai laju proliferasi, Ki-67 juga sering dianalisis bersama *marker* apoptosis, seperti caspase-3 atau Bcl-2, untuk menilai keseimbangan antara proliferasi dan kematian sel. Analisis ini memberikan gambaran yang lebih lengkap mengenai dinamika tumor dan respons terhadap terapi. Penting

untuk dicatat bahwa ekspresi Ki-67 bukanlah spesifik untuk malignansi. Sel regeneratif normal juga dapat menunjukkan ekspresi Ki-67 tinggi, sehingga interpretasi harus selalu dilakukan dalam konteks histopatologis keseluruhan dan dengan mempertimbangkan heterogenitas tumor. Dengan demikian, Ki-67 tidak hanya menjadi indikator proliferasi, tetapi juga memainkan peran penting dalam memahami perilaku biologis tumor, menilai prognosis, dan membantu menentukan strategi terapeutik yang paling tepat. Penggunaan *marker* ini dalam IHK telah menjadi standar dalam evaluasi klinis banyak jenis kanker dan tetap menjadi alat penting dalam penelitian onkologi.

2. p53 dan Marker Checkpoint Sel

Protein p53 merupakan salah satu regulator utama dalam kontrol siklus sel dan mekanisme pertahanan terhadap kerusakan DNA. Dikenal sebagai "*guardian of the genome*" p53 berperan dalam menjaga integritas genom dengan menghentikan proliferasi sel yang mengalami kerusakan genetik dan mencegah akumulasi mutasi yang dapat mengarah pada transformasi neoplastik. Aktivitas p53 paling menonjol pada *checkpoint* G1/S, yang mana dapat menunda transisi sel dari fase G1 ke fase S, memungkinkan perbaikan DNA yang rusak sebelum replikasi. Selain itu, p53 juga berperan dalam menginduksi apoptosis jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, serta mengatur ekspresi sejumlah protein yang terlibat dalam *senescence*, *autophagy*, dan metabolisme sel.

Peran p53 paling penting terjadi pada *checkpoint* G1/S, yaitu titik kontrol sebelum sel memasuki fase replikasi DNA. Pada tahap ini, p53 dapat menunda peralihan sel dari fase G1 ke fase S sampai DNA

yang rusak berhasil diperbaiki. Jika kerusakan DNA terlalu berat dan tidak dapat diperbaiki, p53 akan mengaktifkan proses apoptosis atau kematian sel terprogram. Selain itu, p53 juga ikut mengatur proses lain seperti penuaan sel (*senescence*), autofagi, dan metabolisme sel, yang semuanya berperan dalam menjaga keseimbangan jaringan.

Dalam kondisi normal, protein p53 hanya diproduksi dalam jumlah kecil dan memiliki waktu hidup yang singkat, sehingga pada jaringan sehat ekspresinya biasanya rendah. Namun pada banyak jenis tumor, gen p53 sering mengalami mutasi. Mutasi ini menyebabkan protein p53 menjadi tidak berfungsi dengan baik dan menumpuk di dalam inti sel. Penumpukan tersebut dapat dideteksi melalui pemeriksaan IHK yang menunjukkan pewarnaan inti sel yang kuat dan luas. Oleh karena itu, pemeriksaan p53 dengan IHK tidak hanya membantu mendeteksi adanya mutasi genetik, tetapi juga memberikan gambaran tentang apakah sistem kontrol siklus sel masih berfungsi dengan baik.

Dalam praktik IHK, ekspresi p53 dinilai berdasarkan persentase sel yang menunjukkan pewarnaan positif serta pola penyebarannya. Pewarnaan yang luas dan merata pada banyak sel biasanya menandakan adanya p53 yang tidak berfungsi akibat mutasi. Sebaliknya, ekspresi yang rendah atau hanya terlihat pada sebagian kecil sel umumnya menunjukkan bahwa p53 masih bekerja secara normal. Untuk mendapatkan gambaran yang lebih lengkap mengenai mekanisme kontrol siklus sel, p53 sering dianalisis bersama protein lain seperti p21, p27, CHK1, dan CHK2. Protein p21 dan p27 berfungsi sebagai penghambat pembelahan sel dengan menghentikan siklus sel pada fase G1, sedangkan CHK1 dan CHK2 berperan sebagai

sensor yang mendeteksi kerusakan DNA dan mengaktifkan p53.

Dari sudut pandang klinis, ekspresi p53 memiliki nilai prognostik yang penting. Mutasi p53 sering dikaitkan dengan tumor yang lebih agresif, pertumbuhan yang cepat, serta kemungkinan resistensi terhadap radioterapi atau kemoterapi. Pada berbagai jenis kanker seperti kanker payudara, kolorektal, paru-paru, dan ovarium, status p53 dapat membantu memprediksi perilaku tumor dan mendukung pemilihan strategi terapi. Regulasi p53 juga berkaitan dengan *Mouse Double Minute 2 homolog* (MDM2), yang dapat berkontribusi terhadap pengaturan aktivitas proliferasi pada tumor odontogenik (Sandra, 2002). Jika analisis p53 dikombinasikan dengan marker proliferasi seperti Ki-67 atau *marker* apoptosis seperti caspase-3, maka gambaran mengenai keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian sel menjadi lebih jelas, sehingga membantu penilaian prognosis.

Pemahaman mengenai jalur *checkpoint* yang melibatkan p53 juga penting dalam pengembangan terapi kanker modern. Beberapa penelitian saat ini berfokus pada obat yang dapat mengaktifkan kembali fungsi p53 atau menghambat protein lain dalam jalur *checkpoint*, seperti CHK1 dan CHK2, untuk memicu kematian sel kanker. Dengan demikian, p53 dan marker *checkpoint* sel tidak hanya berperan sebagai alat diagnostik, tetapi juga menjadi target penting dalam pengembangan terapi yang lebih spesifik dan personal.

3. Marker Apoptosis: Bcl-2, Caspase, dan Regulasi *Programmed Cell Death*

Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan mekanisme

biologis penting yang menjaga keseimbangan jumlah sel dalam jaringan. Proses ini memungkinkan tubuh menghilangkan sel yang rusak, tua, atau berpotensi menjadi ganas tanpa menimbulkan reaksi peradangan. Dalam konteks patologi, terutama pada kanker, gangguan pada mekanisme apoptosis dapat menyebabkan akumulasi sel abnormal dan berkontribusi pada pertumbuhan tumor. Ekspresi protein keluarga Bcl-2 dapat menunjukkan perbedaan pola proliferasi dan apoptosis pada kompartemen tumor yang berbeda (Sandra, 2001). Oleh karena itu, evaluasi marker apoptosis melalui IHK menjadi penting untuk memahami dinamika pertumbuhan dan kelangsungan hidup sel tumor.

Apoptosis dikendalikan oleh dua jalur utama, yaitu jalur intrinsik (mitokondrial) dan jalur ekstrinsik (reseptor kematian). Kedua jalur ini pada akhirnya mengaktifkan sekelompok enzim proteolitik yang disebut caspase, yang berperan sebagai eksekutor utama kematian sel. Regulasi proses ini sangat dipengaruhi oleh keluarga protein Bcl-2, yang mengatur keseimbangan antara sinyal pro-apoptotik dan anti-apoptotik.

Protein Bcl-2 merupakan protein anti-apoptotik yang terletak pada membran mitokondria dan berfungsi mencegah pelepasan faktor pro-apoptotik. Pada jalur intrinsik, protein pro-apoptotik seperti Bax dan Bak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria, sehingga memicu pelepasan sitokrom c ke sitoplasma. Sitokrom c kemudian mengaktifkan caspase-9 yang memicu rangkaian aktivasi caspase eksekutor, terutama caspase-3 dan caspase-7, yang akhirnya menyebabkan apoptosis. Protein Bcl-2 bekerja dengan menghambat aktivitas Bax dan Bak, sehingga menjaga stabilitas membran

mitokondria dan membantu mempertahankan kelangsungan hidup sel. Pada banyak jenis tumor, terjadi peningkatan ekspresi Bcl-2 yang menyebabkan sel menjadi lebih resisten terhadap apoptosis. Kondisi ini memungkinkan sel tumor bertahan hidup lebih lama dan sering dikaitkan dengan resistensi terhadap terapi sitotoksik. Dalam pemeriksaan IHK, ekspresi Bcl-2 biasanya terlihat sebagai pewarnaan sitoplasmik, dan intensitas serta luas pewarnaan memberikan gambaran mengenai tingkat aktivitas anti-apoptotik dalam jaringan.

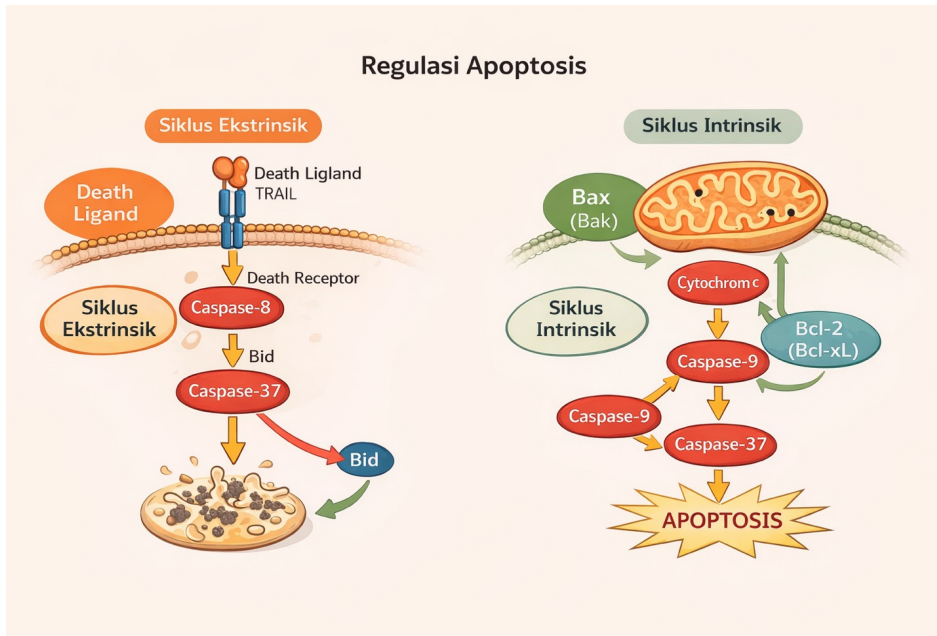
Sebaliknya, caspase merupakan kelompok enzim yang berperan sebagai pelaksana apoptosis. Caspase dibagi menjadi caspase inisiator (seperti caspase-8 dan caspase-9) dan caspase eksekutor (terutama caspase-3 dan caspase-7). Aktivasi caspase menyebabkan pemecahan berbagai komponen seluler penting, termasuk protein sitoskeleton dan DNA, yang akhirnya menghasilkan kematian sel terprogram. Dalam analisis IHK, keberadaan caspase-3 aktif sering digunakan sebagai indikator bahwa sel sedang mengalami apoptosis. Pewarnaan biasanya tampak pada sitoplasma dan kadang pada inti sel. Tingginya ekspresi caspase aktif dalam jaringan tumor dapat menunjukkan peningkatan aktivitas apoptosis, yang dalam beberapa kasus berkaitan dengan respons terapi yang lebih baik.

Keseimbangan antara protein anti-apoptotik seperti Bcl-2 dan aktivitas caspase menentukan nasib sel, apakah akan bertahan hidup atau menjalani kematian terprogram. Dalam jaringan normal, keseimbangan ini dipertahankan secara ketat untuk menjaga homeostasis. Namun pada tumor, keseimbangan tersebut sering terganggu. Overekspresi Bcl-2 atau penurunan aktivasi caspase dapat

menghambat apoptosis dan memungkinkan proliferasi sel yang tidak terkendali. Oleh karena itu, analisis kombinasi *marker* apoptosis memberikan gambaran penting mengenai dinamika biologis tumor.

Dari perspektif klinis, marker apoptosis memiliki nilai prognostik dan terapeutik yang signifikan. Tumor dengan ekspresi Bcl-2 tinggi sering menunjukkan ketahanan terhadap kemoterapi dan radioterapi, karena sel menjadi lebih sulit mengalami apoptosis. Sebaliknya, peningkatan aktivitas caspase dapat menandakan efektivitas terapi yang memicu kematian sel kanker. Pada bidang kedokteran gigi, jalur apoptosis pada tumor rongga mulut dapat melibatkan interaksi antara ligand apoptosis dan regulator ekstraseluler yang memengaruhi respons sel tumor (Sandra, 2006). Oleh karena itu, evaluasi marker apoptosis membantu dalam penilaian prognosis dan pemilihan strategi terapi.

Selain sebagai alat diagnostik, jalur apoptosis juga menjadi target penting dalam pengembangan terapi kanker modern. Obat-obatan yang menargetkan keluarga Bcl-2, seperti inhibitor Bcl-2, dikembangkan untuk mengembalikan kemampuan sel tumor menjalani apoptosis. Dengan demikian, pemahaman mengenai *marker* apoptosis tidak hanya penting untuk interpretasi histopatologis, tetapi juga memiliki implikasi langsung dalam pengembangan terapi yang lebih efektif dan terarah.



Gambar 11. Skema regulasi apoptosis melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik.

Skema gambar diatas menggambarkan dua jalur utama apoptosis, yaitu jalur ekstrinsik yang dimediasi oleh aktivasi *death receptor* dan jalur intrinsik yang dikendalikan oleh mitokondria. Pada jalur ekstrinsik, pengikatan death ligand pada reseptor membran mengaktifkan caspase-8, yang selanjutnya mengaktifkan caspase eksekutor (caspase-3/7) dan memicu kematian sel. Pada jalur intrinsik, protein pro-apoptotik seperti Bax/Bak menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria, yang mengaktifkan caspase-9 dan kemudian caspase-3/7. Protein anti-apoptotik seperti Bcl-2/Bcl-xL menghambat proses ini dengan menjaga stabilitas membran mitokondria. Aktivasi rangkaian caspase pada kedua jalur tersebut berujung pada apoptosis.

4. **Marker Siklus Sel Lainnya dan *Checkpoint Inhibitors***

Siklus sel merupakan proses biologis yang sangat terkoordinasi yang mengatur pertumbuhan dan pembelahan sel melalui tahapan G1, S, G2, dan M. Regulasi yang ketat terhadap siklus ini penting untuk menjaga stabilitas genom dan homeostasis jaringan. Gangguan pada mekanisme kontrol siklus sel merupakan salah satu ciri utama transformasi neoplastik, karena memungkinkan sel mengalami proliferasi yang tidak terkendali dan menghindari mekanisme pengawasan normal.

Pengaturan progresi siklus sel terutama dimediasi oleh interaksi antara cyclin dan *cyclin-dependent kinases* (CDKs). Kompleks cyclin-CDK bekerja melalui fosforilasi protein target untuk mengendalikan transisi antar fase. *Cyclin D* bersama CDK4/6 berperan pada fase G1 awal, sedangkan kompleks cyclin E-CDK2 mengontrol transisi dari fase G1 ke fase S. *Cyclin A* terlibat dalam replikasi DNA selama fase S dan G2, sementara cyclin B-CDK1 diperlukan untuk inisiasi mitosis. Ekspresi berlebih pada *cyclin* tertentu, khususnya *cyclin D1*, sering ditemukan pada berbagai keganasan dan berkaitan dengan peningkatan aktivitas proliferasi. Oleh karena itu, protein-protein ini sering dievaluasi melalui IHC sebagai indikator deregulasi siklus sel.

Aktivitas kompleks cyclin-CDK dikendalikan oleh kelompok protein penghambat yang dikenal sebagai CDK inhibitors (CKIs), yang mencakup keluarga INK4 (seperti p16 dan p15) serta keluarga Cip/Kip (p21, p27, dan p57). Protein-protein ini berperan penting dalam menghentikan progresi siklus sel sebagai respons terhadap stres seluler atau kerusakan DNA. Dalam konteks ini, protein *tumor suppressor* p53 memiliki peran sentral sebagai penjaga

integritas genom. Aktivasi p53 akibat kerusakan DNA menginduksi ekspresi p21, yang kemudian menghambat aktivitas CDK dan menyebabkan penghentian siklus sel pada fase G1. Mekanisme ini memberikan kesempatan bagi sel untuk memperbaiki kerusakan DNA sebelum melanjutkan pembelahan. Mutasi atau inaktivasi p53 mengakibatkan hilangnya kontrol checkpoint, sehingga sel dapat terus membelah meskipun membawa kerusakan genetik.

Selain p53, protein retinoblastoma (Rb) merupakan regulator kunci dalam checkpoint G1/S. Dalam keadaan aktif (hipofosforilasi), Rb mengikat faktor transkripsi E2F dan mencegah ekspresi gen yang diperlukan untuk replikasi DNA. Fosforilasi Rb oleh kompleks *cyclin*-CDK menyebabkan pelepasan E2F dan memungkinkan sel memasuki fase S. Disfungsi jalur Rb sering ditemukan pada kanker dan berkontribusi terhadap proliferasi sel yang tidak terkendali.

Evaluasi IHK terhadap marker proliferasi seperti Ki-67 dan *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) memberikan informasi tambahan mengenai aktivitas siklus sel. Ki-67 diekspresikan selama fase aktif siklus sel tetapi tidak pada fase istirahat, sehingga indeks Ki-67 mencerminkan fraksi proliferaatif jaringan. Nilai yang tinggi umumnya berkorelasi dengan agresivitas tumor dan prognosis yang lebih buruk. PCNA, yang terlibat dalam replikasi DNA, juga digunakan sebagai indikator aktivitas proliferaatif, meskipun ekspresinya dapat bertahan lebih lama dibandingkan Ki-67.

Siklus sel diawasi oleh sistem *checkpoint* yang memastikan setiap tahap berlangsung secara akurat sebelum sel melanjutkan ke fase berikutnya. *Checkpoint* G1/S mencegah replikasi DNA yang

rusak, sedangkan *checkpoint* G2/M memastikan bahwa replikasi DNA telah selesai dengan benar sebelum mitosis. Protein sensor kerusakan DNA seperti ATM dan ATR mengaktifkan jalur sinyal yang melibatkan kinase CHK1 dan CHK2. Aktivasi jalur ini menyebabkan penghentian siklus sel melalui inhibisi CDK dan stabilisasi p53. Kegagalan mekanisme *checkpoint* mengakibatkan instabilitas genom dan akumulasi mutasi yang mendorong karsinogenesis.

Dalam perkembangan terapi modern, konsep *checkpoint* juga mencakup regulasi respons imun terhadap tumor. Sel kanker dapat mengeksploitasi jalur *checkpoint* imun untuk menghindari pengawasan sistem imun. Terapi berbasis *checkpoint inhibitors* bekerja dengan memblokir sinyal inhibitori ini sehingga mengaktifkan kembali respons imun terhadap sel tumor. Pendekatan ini telah merevolusi terapi onkologi dengan memberikan hasil klinis yang signifikan pada berbagai jenis kanker, meskipun dapat disertai efek samping berupa reaksi autoimun akibat peningkatan aktivasi imun.

Secara keseluruhan, analisis *marker* siklus sel dan *checkpoint* memberikan wawasan penting mengenai dinamika proliferasi sel, integritas mekanisme kontrol, dan potensi respons terhadap terapi. Evaluasi terpadu terhadap protein-protein regulator ini melalui IHC berperan besar dalam diagnosis, penentuan prognosis, dan pengembangan strategi terapi yang lebih terarah dalam patologi modern.

PERTANYAAN:

1. Jelaskan bagaimana marker proliferasi Ki-67 dan protein regulator p53 digunakan dalam pemeriksaan IHK untuk menilai aktivitas proliferasi sel dan integritas *checkpoint* siklus sel, serta kaitannya dengan prognosis tumor.
2. Uraikan mekanisme regulasi apoptosis yang melibatkan protein Bcl-2 dan caspase, serta jelaskan bagaimana ketidakseimbangan kedua *marker* tersebut dapat berkontribusi pada perkembangan dan resistensi terapi kanker.
3. Diskusikan peran berbagai *marker* siklus sel, termasuk kompleks cyclin-CDK dan *checkpoint inhibitors*, dalam pengendalian proliferasi sel, serta jelaskan implikasi klinisnya dalam diagnosis dan terapi kanker.

RINGKASAN:

Marker proliferasi, siklus sel, dan apoptosis merupakan komponen penting dalam analisis IHK untuk menilai dinamika pertumbuhan dan kematian sel pada jaringan tumor. Pemeriksaan marker ini membantu diagnosis, penentuan prognosis, dan pemilihan terapi karena mencerminkan keseimbangan antara proliferasi sel, kontrol siklus sel, dan kematian sel terprogram.

Ki-67 merupakan marker proliferasi utama yang diekspresikan pada sel yang aktif membelah. Nilai Ki-67 dinilai melalui labeling index dan mencerminkan tingkat proliferasi tumor. Ekspresi Ki-67 yang tinggi biasanya berkaitan dengan tumor yang lebih agresif dan prognosis yang lebih buruk.

p53 dan *marker checkpoint* sel berperan dalam pengaturan siklus sel dan perbaikan DNA. Protein p53 menghentikan pembelahan sel yang mengalami kerusakan genetik atau menginduksi apoptosis jika kerusakan tidak dapat diperbaiki. Mutasi p53 sering menyebabkan akumulasi protein dalam inti sel dan berkaitan dengan pertumbuhan tumor yang lebih agresif. *Marker checkpoint* lain seperti p21, p27, CHK1, dan CHK2 membantu menilai fungsi kontrol siklus sel.

Marker apoptosis seperti Bcl-2 dan caspase menunjukkan keseimbangan antara kelangsungan hidup dan kematian sel. Bcl-2 bersifat anti-apoptotik dan sering meningkat pada tumor sehingga sel menjadi lebih resisten terhadap terapi. Sebaliknya, aktivasi caspase, terutama caspase-3, menunjukkan terjadinya apoptosis dan sering dikaitkan dengan respons terapi yang lebih baik.

Selain itu, *marker* siklus sel seperti cyclin, CDK, p16, p21, p27, dan protein Rb berperan dalam mengatur transisi antar fase siklus sel.

Gangguan pada sistem ini menyebabkan proliferasi yang tidak terkendali dan merupakan ciri khas keganasan. Evaluasi *marker* siklus sel bersama Ki-67 dan marker apoptosis memberikan gambaran yang lebih lengkap mengenai perilaku biologis tumor dan potensi respons terhadap terapi.

C. Marker Angiogenesis, Invasivitas, dan Metastasis

Pertumbuhan dan penyebaran tumor tidak hanya ditentukan oleh kemampuan sel untuk berproliferasi, tetapi juga oleh kemampuannya membentuk pembuluh darah baru, menembus jaringan sekitarnya, dan bermetastasis ke organ lain. Proses angiogenesis, invasivitas, dan metastasis merupakan tahapan penting dalam progresi kanker yang dapat dievaluasi melalui berbagai *marker* IHK. Analisis *marker* ini memberikan gambaran mengenai agresivitas biologis tumor, potensi penyebaran, serta kemungkinan respon terhadap terapi.

1. VEGF, CD31, dan Penilaian *Microvascular Density*

Angiogenesis merupakan proses biologis pembentukan pembuluh darah baru dari jaringan vaskular yang telah ada. Dalam kondisi fisiologis, angiogenesis berperan penting pada proses pertumbuhan, penyembuhan luka, dan regenerasi jaringan. Namun, pada tumor, angiogenesis menjadi mekanisme kunci yang memungkinkan massa tumor tumbuh melampaui ukuran tertentu dengan menyediakan suplai oksigen dan nutrisi yang memadai. Tanpa angiogenesis, pertumbuhan tumor akan terbatas karena difusi oksigen hanya efektif pada jarak yang sangat pendek. Oleh karena itu, kemampuan tumor untuk menginduksi angiogenesis merupakan salah satu karakteristik utama keganasan.

Salah satu regulator sentral angiogenesis adalah *vascular endothelial growth factor* (VEGF), yaitu faktor pertumbuhan yang secara spesifik menstimulasi proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel endotel (Li, 2005). Ekspresi VEGF pada sel tumor umumnya dipicu

oleh kondisi hipoksia melalui aktivasi jalur *hypoxia-inducible factor* (HIF). Ketika jaringan tumor mengalami kekurangan oksigen, HIF akan mengaktifkan transkripsi gen VEGF, yang kemudian disekresikan ke lingkungan mikro tumor. VEGF yang dilepaskan akan berikatan dengan reseptornya pada sel endotel, memicu pembentukan kapiler baru yang menembus jaringan tumor.

Dalam pemeriksaan IHK, ekspresi VEGF biasanya terlihat sebagai pewarnaan sitoplasmik pada sel tumor, dan kadang juga pada sel stroma di sekitarnya. Evaluasi ekspresi VEGF dapat dilakukan secara semi-kuantitatif berdasarkan intensitas pewarnaan dan persentase sel positif. Ekspresi VEGF yang tinggi sering dikaitkan dengan peningkatan aktivitas angiogenesis, laju pertumbuhan tumor yang lebih cepat, invasi yang lebih agresif, serta risiko metastasis yang lebih besar. Karena perannya yang penting dalam progresi tumor, VEGF memiliki nilai prognostik yang signifikan dan menjadi target utama dalam terapi anti-angiogenik, seperti penggunaan antibodi monoklonal atau inhibitor tirosin kinase yang menekan jalur VEGF.

Untuk menilai tingkat angiogenesis secara lebih objektif, digunakan parameter *microvascular density* (MVD), yaitu pengukuran kuantitatif jumlah mikropembuluh darah dalam jaringan tumor (Rahaju, 2021). Penilaian MVD didasarkan pada pewarnaan sel endotel menggunakan marker spesifik, seperti CD31, CD34, atau faktor von Willebrand. Di antara marker tersebut, CD31 dikenal sebagai marker yang sangat sensitif dan relatif spesifik untuk sel endotel, sehingga sering digunakan dalam penelitian dan praktik diagnostik untuk mengidentifikasi struktur vaskular.

Metodologi penilaian MVD biasanya melibatkan identifikasi area dengan kepadatan vaskular tertinggi, yang dikenal sebagai *hotspot*. Setelah *hotspot* ditentukan pada pembesaran rendah, jumlah pembuluh darah dihitung pada beberapa lapang pandang pembesaran tinggi. Setiap struktur vaskular yang menunjukkan pewarnaan positif pada endotel dan terpisah dari pembuluh lain dihitung sebagai satu unit, terlepas dari ada tidaknya lumen yang jelas. Nilai rata-rata dari beberapa lapang pandang kemudian digunakan sebagai representasi MVD tumor tersebut.

Nilai MVD yang tinggi mencerminkan aktivitas angiogenesis yang intens dan sering dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk. Tumor dengan MVD tinggi cenderung memiliki kemampuan lebih besar untuk mempertahankan pertumbuhan, meningkatkan peluang invasi lokal, serta memfasilitasi penyebaran sel kanker melalui sirkulasi darah. Selain sebagai indikator prognostik, MVD juga digunakan untuk mengevaluasi efektivitas terapi anti-angiogenik, di mana penurunan kepadatan vaskular dapat mencerminkan respons terapi.

Selain aspek kuantitatif, pola distribusi vaskular dalam tumor juga memiliki arti biologis. Pembuluh darah tumor sering kali bersifat abnormal, dengan struktur yang tidak teratur dan permeabilitas tinggi. Karakteristik ini tidak hanya mendukung pertumbuhan tumor, tetapi juga memengaruhi penetrasi obat kemoterapi dan respons terhadap radioterapi. Oleh karena itu, analisis VEGF dan MVD melalui IHK memberikan wawasan penting mengenai interaksi antara sel tumor dan mikrolingkungan vaskularnya. Secara keseluruhan, evaluasi VEGF dan MVD merupakan komponen penting dalam analisis

patologi tumor. Informasi yang diperoleh tidak hanya membantu memahami tingkat angiogenesis dan agresivitas biologis tumor, tetapi juga memiliki implikasi langsung dalam penentuan prognosis dan pemilihan strategi terapi berbasis target angiogenesis.

2. MMPs dan Enzim Proteolitik Lainnya

Kemampuan sel tumor untuk menginvasi jaringan sekitarnya merupakan langkah penting dalam progresi kanker menuju metastasis (Miguel, 2020). Proses invasi ini tidak hanya bergantung pada motilitas sel, tetapi juga pada kemampuan sel tumor untuk menembus penghalang struktural berupa matriks ekstraseluler (*extracellular matrix*, ECM) dan membran basal. Struktur ini secara normal berfungsi sebagai penopang jaringan dan penghalang fisik terhadap migrasi sel. Untuk dapat menembusnya, sel tumor memanfaatkan berbagai enzim proteolitik yang mampu mendegradasi komponen ECM secara terkontrol.

Kelompok enzim yang paling berperan dalam proses ini adalah *matrix metalloproteinases* (MMPs), yaitu keluarga enzim protease yang bergantung pada ion seng (*zinc-dependent endopeptidases*). MMP memiliki kemampuan untuk memecah berbagai komponen ECM, termasuk kolagen, laminin, fibronectin, dan proteoglikan. Di antara berbagai anggota keluarga ini, MMP-2 dan MMP-9 (gelatinase A dan gelatinase B) merupakan enzim yang paling sering dikaitkan dengan progresi kanker karena kemampuannya mendegradasi kolagen tipe IV, komponen utama membran basal.

Produksi MMP tidak hanya berasal dari sel tumor, tetapi juga dari sel stroma di sekitarnya, seperti fibroblas, sel inflamasi, dan sel endotel. Interaksi antara sel tumor dan mikrolingkungan sekitarnya menciptakan jaringan sinyal yang kompleks yang merangsang sekresi MMP. Selain itu, aktivitas MMP diatur secara ketat oleh *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs). Ketidakseimbangan antara MMP dan TIMP, khususnya peningkatan aktivitas MMP relatif terhadap inhibitor alaminya, berkontribusi pada peningkatan invasivitas tumor.

Dalam pemeriksaan IHK, ekspresi MMP biasanya tampak sebagai pewarnaan sitoplasmik pada sel tumor dan sering juga terdeteksi pada sel stroma di sekitarnya. Evaluasi ekspresi MMP dapat dilakukan secara semi-kuantitatif berdasarkan intensitas pewarnaan dan distribusi sel positif. Tingginya ekspresi MMP sering berkorelasi dengan invasi lokal yang lebih agresif, peningkatan potensi metastasis, dan prognosis yang kurang baik. Selain sebagai indikator invasivitas, MMP juga berperan dalam pelepasan faktor pertumbuhan yang terikat pada ECM, sehingga secara tidak langsung merangsang proliferasi dan angiogenesis.

Selain keluarga MMP, beberapa enzim proteolitik lain juga berperan penting dalam proses invasi tumor. Salah satunya adalah *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), yang mengubah plasminogen menjadi plasmin. Plasmin merupakan protease kuat yang tidak hanya mendegradasi komponen ECM secara langsung, tetapi juga dapat mengaktifkan MMP dalam bentuk laten. Sistem uPA berperan sebagai penguat (amplifier) proteolisis dalam mikrolingkungan tumor dan sering dikaitkan dengan peningkatan kemampuan metastasis.

Kelompok enzim lain yang terlibat adalah *cathepsins*, yaitu protease lisosomal yang dapat dilepaskan ke ruang ekstraseluler oleh sel tumor. *Cathepsins* berkontribusi pada degradasi matriks dan *remodeling* jaringan, serta memengaruhi adhesi dan migrasi sel. Aktivitas gabungan antara MMP, uPA, dan *cathepsins* menciptakan lingkungan yang mendukung pergerakan sel tumor melalui jaringan dan masuk ke dalam pembuluh darah atau limfatik.

Selain fungsi degradasi struktural, enzim proteolitik juga memiliki peran penting dalam modulasi sinyal biologis. Degradasi ECM dapat melepaskan fragmen bioaktif dan faktor pertumbuhan yang memengaruhi proliferasi, angiogenesis, dan respons imun. Dengan demikian, proteolisis tidak hanya bersifat mekanis, tetapi juga berperan sebagai regulator dinamis dalam komunikasi antara sel tumor dan mikrolingkungannya.

Dari perspektif klinis, ekspresi tinggi MMP dan enzim proteolitik lainnya sering dikaitkan dengan stadium tumor yang lebih lanjut, peningkatan risiko metastasis, dan penurunan kelangsungan hidup pasien. Oleh karena itu, *marker* ini memiliki nilai prognostik yang penting. Selain itu, jalur proteolitik menjadi target penelitian terapi antikanker, dengan pengembangan inhibitor MMP dan modulator sistem protease sebagai upaya untuk menghambat invasi dan metastasis tumor. Secara keseluruhan, MMP dan enzim proteolitik lainnya merupakan komponen kunci dalam mekanisme invasi tumor. Evaluasi ekspresinya melalui IHK memberikan informasi penting mengenai potensi

agresivitas tumor dan membantu memahami interaksi kompleks antara sel kanker dan mikrolingkungan jaringan di sekitarnya.

3. Marker EMT dan Molekul Adhesi Terkait Metastasis

Metastasis merupakan proses kompleks yang memungkinkan sel tumor menyebar dari lokasi primer ke organ lain. Salah satu mekanisme biologis kunci yang mendasari kemampuan ini adalah *epithelial-mesenchymal transition* (EMT). EMT adalah proses di mana sel epitel yang semula memiliki adhesi kuat, polaritas yang jelas, dan keterikatan dengan membran basal mengalami perubahan fenotip menjadi sel dengan sifat mesenkimal yang lebih motil dan invasif. Perubahan ini memungkinkan sel tumor melepaskan diri dari massa primer, menembus jaringan sekitar, dan memasuki sirkulasi darah atau limfatik.

Pada jaringan epitel normal, stabilitas struktur jaringan sangat bergantung pada molekul adhesi antar sel. Salah satu molekul yang paling penting adalah E-cadherin, protein transmembran yang membentuk *adherens junction* dan menjaga kohesi sel epitel. Penurunan atau hilangnya ekspresi E-cadherin merupakan ciri khas EMT dan sering dianggap sebagai peristiwa awal dalam proses metastasis. Kehilangan fungsi E-cadherin menyebabkan melemahnya ikatan antar sel, sehingga sel tumor lebih mudah terlepas dan bermigrasi. Dalam pemeriksaan IHK, hilangnya pewarnaan membran E-cadherin atau perubahan lokasinya menjadi sitoplasmik merupakan indikator gangguan adhesi dan biasanya berkorelasi dengan derajat keganasan yang lebih tinggi.

Seiring dengan berkurangnya *marker epitelial*, sel tumor yang mengalami EMT menunjukkan peningkatan ekspresi *marker mesenkimal*, seperti vimentin dan N-cadherin. Vimentin adalah protein filamen intermediat yang meningkatkan fleksibilitas dan kemampuan migrasi sel, sedangkan N-cadherin memfasilitasi interaksi sel dengan stroma sekitarnya. Peralihan ekspresi dari E-cadherin ke N-cadherin, yang dikenal sebagai cadherin switching, merupakan indikator penting terjadinya EMT. Dalam analisis IHC, kombinasi penurunan E-cadherin dan peningkatan vimentin atau N-cadherin sering digunakan untuk mengidentifikasi tumor dengan potensi invasif tinggi.

Selain perubahan pada molekul cadherin, EMT juga melibatkan modifikasi berbagai molekul adhesi dan struktur sitoskeleton lainnya. Kompleks β -catenin, yang berperan dalam adhesi sel sekaligus jalur sinyal Wnt, sering mengalami redistribusi dari membran ke sitoplasma atau inti sel selama EMT. Aktivasi jalur Wnt/ β -catenin dapat meningkatkan ekspresi gen yang mendorong proliferasi dan migrasi sel. Di samping itu, perubahan ekspresi integrin dan protein focal adhesi meningkatkan kemampuan sel tumor untuk berinteraksi dengan matriks ekstraseluler dan memfasilitasi invasi jaringan.

Regulasi EMT dikendalikan oleh sejumlah faktor transkripsi, termasuk Snail, Slug, Twist, dan ZEB1/2, yang menekan ekspresi gen epitelial dan mengaktifkan gen mesenkimal. Faktor-faktor ini dipicu oleh berbagai sinyal dari mikrolingkungan tumor, seperti TGF- β , hipoksia, dan mediator inflamasi. Aktivasi faktor transkripsi EMT tidak hanya meningkatkan motilitas sel, tetapi juga berkontribusi terhadap resistensi terhadap apoptosis dan terapi antikanker.

Dalam IHK, ekspresi nuklear faktor-faktor ini sering dikaitkan dengan prognosis yang buruk dan peningkatan risiko metastasis.

EMT juga berkaitan erat dengan konsep *cancer stem cell* dan plastisitas sel tumor. Sel yang telah mengalami EMT cenderung memiliki sifat seperti sel punca, termasuk kemampuan bertahan terhadap stres dan terapi. Setelah mencapai organ target, sel-sel ini dapat mengalami proses kebalikan yang disebut *mesenchymal-epithelial transition* (MET) untuk membentuk koloni tumor sekunder. Dinamika EMT-MET ini menjelaskan bagaimana sel tumor dapat beradaptasi pada berbagai tahap metastasis.

Dalam praktik diagnostik, evaluasi marker EMT melalui IHK biasanya dilakukan menggunakan panel marker yang mencakup E-cadherin, vimentin, N-cadherin, dan kadang β -catenin atau faktor transkripsi EMT. Pendekatan panel memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai status transisi fenotip sel tumor dibandingkan penggunaan satu marker saja. Tumor dengan profil EMT yang menonjol umumnya menunjukkan invasi lokal yang lebih agresif, kecenderungan metastasis yang tinggi, dan respons terapi yang kurang baik.

Dari perspektif klinis, *marker* EMT memiliki nilai prognostik penting dan menjadi fokus penelitian dalam pengembangan terapi target. Strategi terapeutik yang bertujuan menghambat jalur EMT diharapkan dapat menekan migrasi dan invasi sel kanker. Oleh karena itu, pemahaman mengenai marker EMT dan molekul adhesi terkait tidak hanya memperkaya interpretasi histopatologis, tetapi juga memberikan wawasan mendalam mengenai mekanisme metastasis serta peluang intervensi terapeutik yang lebih spesifik.

4. **Marker Metastasis Spesifik Lokasi dan Perpindahan Sel**

Metastasis adalah proses penyebaran sel kanker dari lokasi primer ke organ lain yang jauh dan merupakan penyebab utama kematian terkait kanker. Proses ini tidak terjadi secara acak, melainkan merupakan rangkaian peristiwa biologis yang sangat terorganisasi. Sel tumor harus melepaskan diri dari massa primer, menembus jaringan sekitarnya, masuk ke dalam sirkulasi darah atau limfatik, bertahan hidup selama perjalanan, kemudian keluar dari pembuluh dan berkolonisasi di organ target. Keberhasilan setiap tahap ini bergantung pada perubahan molekuler spesifik yang memungkinkan sel tumor beradaptasi dengan lingkungan baru.

Konsep "*seed and soil*" menjelaskan bahwa metastasis terjadi ketika sel tumor sebagai "*seed*" (benih) menemukan organ dengan lingkungan mikro yang sesuai sebagai "*soil*" (tanah). Oleh karena itu, penyebaran metastasis sangat dipengaruhi oleh interaksi antara karakteristik intrinsik sel kanker dan kondisi biologis organ tujuan. *Marker* (penanda) metastasis spesifik melalui IHC membantu mengidentifikasi asal kanker dan memprediksi organ target metastasis serta menilai agresivitas biologis tumor.

a. *Marker Metastasis Berdasarkan Lokasi (Site-Specific)*

Lokasi metastasis sering kali menunjukkan pola khas tergantung jenis kanker primer. Beberapa organ memiliki kerentanan khusus terhadap kolonisasi sel tumor tertentu. Berikut adalah beberapa marker dan lokasi penyebaran yang umum diketahui:

- **Tulang**

Metastasis tulang sering ditemukan pada kanker payudara,

prostat, dan paru. Proses ini melibatkan interaksi antara sel tumor dan sel tulang yang dimediasi oleh molekul seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β) dan *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP). Aktivasi jalur ini meningkatkan remodeling tulang dan menciptakan lingkungan yang mendukung pertumbuhan sel kanker. Dalam IHK, ekspresi marker yang terkait dengan aktivitas osteolitik atau osteoblastik dapat memberikan petunjuk mengenai kecenderungan metastasis tulang.

- **Hati (Liver)**

Hati sering menjadi lokasi metastasis, terutama pada kanker kolorektal melalui sirkulasi mesenterik. Sel tumor yang mencapai hati memanfaatkan lingkungan mikro yang kaya faktor pertumbuhan dan vaskularisasi tinggi. Metastasis hati umumnya menunjukkan perilaku biologis sel kanker yang agresif dan berhubungan dengan prognosis yang lebih buruk.

- **Paru-paru**

Paru-paru merupakan salah satu lokasi paling sering terjadinya metastasis. Marker seperti CYFRA21-1, CEA, dan SCC antigen sering digunakan sebagai indikator keterlibatan paru. Jaringan paru menyediakan permukaan kapiler luas yang memudahkan penjejakan sel tumor dalam sirkulasi.

- **Kelenjar Getah Bening**

Penyebaran ke kelenjar getah bening, terutama aksila pada kanker payudara, merupakan indikator penting progresi penyakit dan berkaitan erat dengan peningkatan

risiko metastasis sistemik. Pada proses ini, sel tumor yang mengekspresikan molekul adhesi tertentu memiliki kemampuan lebih tinggi untuk bertahan hidup, bermigrasi, dan berkolonisasi di jaringan limfatik. Salah satu molekul yang berperan adalah CD44, suatu glikoprotein permukaan sel yang terlibat dalam adhesi sel–matriks dan interaksi dengan asam hialuronat. Ekspresi CD44 yang tinggi pada sel tumor sering dikaitkan dengan fenotip sel punca kanker (*cancer stem cell*), yang berkontribusi terhadap peningkatan kapasitas invasi, metastasis, dan resistensi terhadap terapi. Dengan demikian, keberadaan CD44 mencerminkan karakter biologis agresif sel tumor yang berpotensi memfasilitasi penyebaran ke kelenjar getah bening, bukan sebagai marker spesifik jaringan limfatik itu sendiri.

– **Marker histopatologi untuk pelacakan asal tumor**

Dalam kasus metastasis dengan asal primer tidak jelas, panel marker jaringan sangat penting. Marker seperti ER, PR, dan HER2 untuk kanker payudara, PSA untuk kanker prostat, serta tiroglobulin untuk kanker tiroid membantu menentukan sumber tumor metastatik.

b. *Marker dan mekanisme perpindahan sel*

Perpindahan sel tumor dimungkinkan oleh serangkaian perubahan molekuler yang memungkinkan sel melepaskan diri dari tumor primer, memasuki sirkulasi, serta bertahan hidup selama proses penyebaran. Perubahan ini meningkatkan motilitas, kemampuan

invasi, dan ketahanan sel tumor terhadap stres lingkungan, sehingga mendukung terjadinya metastasis.

1. *Epithelial–mesenchymal transition* (EMT)

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) merupakan proses biologis dimana sel epitel yang semula memiliki adhesi kuat antar sel dan polaritas yang teratur berubah menjadi sel dengan sifat mesenkimal yang lebih motil dan invasif. Selama EMT, terjadi penurunan ekspresi molekul adhesi seperti E-cadherin dan peningkatan ekspresi *marker mesenkimal* seperti vimentin dan N-cadherin. Perubahan ini menyebabkan sel tumor kehilangan kohesi dengan jaringan sekitarnya, memperoleh kemampuan bermigrasi, serta meningkatkan resistensi terhadap apoptosis. EMT dianggap sebagai tahap awal yang sangat penting dalam metastasis karena memungkinkan sel tumor melepaskan diri dari massa primer dan mulai menginvasi jaringan di sekitarnya.

2. Reseptor kemokin dan arah migrasi

Migrasi sel tumor menuju organ tertentu tidak terjadi secara acak, melainkan dipandu oleh sistem kemokin dan reseptornya. Reseptor kemokin seperti CXCR4 dan CCR7 yang diekspresikan pada permukaan sel tumor berinteraksi dengan ligan kemokin yang diproduksi oleh organ target. Salah satu contoh penting adalah interaksi antara CXCR4 dan CXCL12, yang membentuk gradien kemotaktik sehingga mengarahkan pergerakan sel tumor ke jaringan yang kaya akan CXCL12, seperti sumsum

tulang, paru-paru, dan hati. Mekanisme ini membantu menjelaskan mengapa beberapa jenis kanker memiliki kecenderungan bermetastasis ke organ tertentu.

3. Penanda sel punca kanker (*cancer stem cells*)

Subpopulasi sel tumor yang memiliki karakteristik seperti sel punca, dikenal sebagai *cancer stem cells* (CSC), berperan penting dalam proses metastasis. Marker seperti CD44 sering digunakan untuk mengidentifikasi sel CSC yang memiliki kemampuan memperbarui diri (*self-renewal*), berdiferensiasi, serta bertahan terhadap stres lingkungan dan terapi antikanker. Sel CSC diyakini mampu bertahan dalam sirkulasi, beradaptasi di lingkungan baru, dan membentuk koloni tumor sekunder. Oleh karena itu, keberadaan *marker* CSC berkaitan erat dengan potensi metastasis, kekambuhan tumor, dan resistensi terhadap terapi.

4. Molekul adhesi dan ekstrasvasi

Setelah memasuki sirkulasi, sel tumor harus berinteraksi dengan endotel pembuluh darah untuk dapat keluar menuju jaringan target. Proses ini dimediasi oleh molekul adhesi seperti *integrins* dan *selectins*. Pada tahap awal terjadi *rolling adhesion*, yaitu perlekatan sementara antara sel tumor dan endotel, yang kemudian diikuti oleh adhesi yang lebih kuat melalui aktivasi integrin. Interaksi ini memungkinkan sel tumor menembus dinding pembuluh darah (ekstrasvasi) dan berinvasi ke jaringan sekitarnya. Kemampuan melakukan adhesi dan ekstrasvasi merupakan

langkah kunci dalam pembentukan metastasis yang berhasil.

5. Penanda darah (*tumor markers*)

Selain *marker* jaringan yang dinilai melalui IHK, penanda tumor dalam darah juga berperan penting dalam pemantauan metastasis. *Marker* serum seperti *carcinoembryonic antigen* (CEA), CA 15-3, CA 19-9, dan CA-125 digunakan secara klinis untuk menilai perkembangan penyakit, respon terhadap terapi, dan kemungkinan kekambuhan. Walaupun *marker* ini tidak selalu spesifik untuk diagnosis awal, perubahan kadar serum dapat mencerminkan beban tumor dan aktivitas metastasis, sehingga berguna sebagai alat pemantauan longitudinal pada pasien kanker.

Setelah sel tumor berhasil melepaskan diri dari tumor primer, bertahan dalam sirkulasi, dan menembus jaringan baru, keberhasilan metastasis sangat ditentukan oleh faktor-faktor yang memengaruhi lokasi kolonisasi. Penyebaran metastasis tidak terjadi secara acak, melainkan mengikuti pola biologis tertentu yang dipengaruhi oleh interaksi kompleks antara karakteristik sel tumor dan lingkungan mikro organ target. Konsep klasik "*seed and soil*" menjelaskan bahwa sel kanker (*seed*) hanya dapat tumbuh pada organ yang memiliki lingkungan mikro (*soil*) yang sesuai untuk mendukung kelangsungan hidup dan proliferasinya.

Beberapa faktor utama yang menentukan lokasi metastasis meliputi pola aliran darah, kesesuaian lingkungan mikro organ, serta regulasi genetik pada sel tumor. Organ yang pertama kali menerima aliran darah dari tumor primer sering menjadi lokasi metastasis awal,

seperti hati pada kanker kolorektal melalui sistem portal. Selain itu, faktor pertumbuhan, sitokin, dan komponen matriks ekstraseluler di organ target dapat menciptakan lingkungan yang mendukung kolonisasi sel tumor. Perubahan pada gen penekan metastasis dan jalur sinyal intraseluler juga memengaruhi kemampuan sel tumor untuk beradaptasi dan berkembang di lokasi sekunder. Kombinasi faktor-faktor ini menjelaskan pola metastasis spesifik yang sering diamati pada berbagai jenis kanker. Pola penyebaran metastasis ditentukan oleh beberapa faktor utama:

- Pola aliran darah, yang menyebabkan sel tumor terjebak pada jaringan kapiler organ pertama yang ditemui
- Kesesuaian lingkungan mikro, yang menyediakan kondisi biologis mendukung kolonisasi
- Gen penekan metastasis, di mana hilangnya fungsi gen tertentu meningkatkan kemampuan tumor tumbuh di lokasi sekunder

Secara klinis, identifikasi marker metastasis memiliki peran penting dalam penentuan stadium penyakit, stratifikasi risiko, dan pemilihan strategi terapi. Tumor dengan profil *marker* yang menunjukkan potensi metastasis tinggi biasanya memerlukan pendekatan terapi yang lebih agresif serta pemantauan jangka panjang yang ketat. Selain itu, berbagai *marker* metastasis kini menjadi target penelitian terapi yang bertujuan menghambat migrasi dan kolonisasi sel kanker.

Dengan demikian, analisis marker metastasis spesifik lokasi dan mekanisme perpindahan sel melalui IHK tidak hanya memperdalam pemahaman mengenai biologi penyebaran

tumor, tetapi juga memberikan landasan penting bagi pengembangan pendekatan diagnostik dan terapeutik modern.

5. Mekanisme *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT) secara Bertahap pada Karsinoma Oral

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) merupakan proses biologis di mana sel epitel kehilangan karakteristik khasnya seperti kohesi antar sel dan polaritas apikal-basal serta memperoleh sifat menyerupai sel mesenkimal yang lebih motil dan invasif (Thiery, 2009). Pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut (*oral squamous cell carcinoma*/OSCC), EMT berperan penting dalam progresi tumor, terutama pada fase invasi lokal dan pembentukan metastasis.

EMT pada karsinoma oral bukanlah peristiwa yang terjadi secara mendadak, melainkan proses bertahap dan dinamis. Transformasi ini melibatkan perubahan molekuler, morfologis, dan fungsional yang berlangsung secara progresif, sering kali dipicu oleh interaksi antara sel tumor dan mikro lingkungan sekitarnya.

Pada epitel normal rongga mulut, sel-sel epitel tersusun rapat melalui molekul adhesi seperti E-cadherin yang menjaga kohesi jaringan. E-cadherin merupakan protein transmembran yang berperan dalam *adherens junction* dan mempertahankan integritas epitel. Pada tahap awal EMT, terjadi penurunan ekspresi E-cadherin yang disebabkan oleh aktivasi faktor transkripsi tertentu, seperti Snail, Slug, Twist, dan ZEB.

Penurunan E-cadherin mengurangi kekuatan adhesi antar sel, sehingga sel tumor mulai kehilangan kohesi. Secara histologis,

perubahan ini dapat terlihat sebagai disorganisasi lapisan epitel dan munculnya sel-sel dengan batas antar sel yang kurang tegas. Dalam pemeriksaan IHK, ekspresi E-cadherin yang semula kuat dan homogen pada membran sel menjadi berkurang atau tidak merata. Pada fase ini, sel masih mempertahankan sebagian karakteristik epitelial, namun telah menunjukkan tanda-tanda awal perubahan fenotipik.

Tahap berikutnya adalah tahap transisi yang ditandai dengan aktivasi program genetik yang lebih luas. Faktor transkripsi EMT seperti *Snail*, *Slug*, *Twist*, dan ZEB tidak hanya menekan ekspresi gen epitelial, tetapi juga menginduksi ekspresi gen mesenkimal. Salah satu perubahan yang sering diamati adalah peningkatan ekspresi vimentin, suatu *intermediate* filament khas sel mesenkimal.

Pada fase ini, terjadi fenomena yang dikenal sebagai “*cadherin switch*”, yaitu penurunan E-cadherin disertai peningkatan N-cadherin. Pergeseran ini meningkatkan kemampuan sel untuk berinteraksi dengan stroma dan matriks ekstraseluler. Secara morfologis, sel tumor mulai tampak lebih lonjong, dengan sitoskeleton yang mengalami reorganisasi.

Selain itu, sel tumor mulai memproduksi enzim proteolitik seperti *matrix metalloproteinases* (MMPs), yang berperan dalam degradasi membran basal dan matriks ekstraseluler. Aktivitas MMP memfasilitasi penetrasi sel tumor ke jaringan sekitarnya, terutama pada area front invasi.

Pada tahap lanjut EMT, sel tumor telah kehilangan sebagian besar karakteristik epitelial dan menunjukkan sifat mesenkimal

yang dominan. Sel menjadi lebih motil, mampu bergerak secara individual, dan lebih resisten terhadap apoptosis. Kemampuan ini sangat penting dalam proses invasi lokal dan potensi metastasis.

Pada *front* invasi OSCC, sering ditemukan sel-sel tumor yang terpisah dari massa utama, dengan morfologi *spindle-like* atau menyerupai fibroblas. Ekspresi vimentin meningkat, sedangkan ekspresi sitokeratin dapat menurun atau menjadi tidak homogen. Fenotip ini mencerminkan keadaan EMT yang lebih matang.

Selain meningkatkan mobilitas, EMT juga dikaitkan dengan peningkatan sifat *stemness* pada sel tumor. Sel yang mengalami EMT dapat menunjukkan karakteristik menyerupai CSC, termasuk kemampuan proliferasi jangka panjang dan resistensi terhadap terapi. Hal ini menjelaskan mengapa tumor dengan aktivitas EMT tinggi sering dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk.

EMT pada karsinoma oral tidak terjadi secara otonom. Berbagai faktor dalam mikro lingkungan tumor berperan sebagai pemicu, termasuk sitokin proinflamasi, *growth factors* seperti TGF- β , serta hipoksia. TGF- β merupakan salah satu induktor EMT yang paling kuat, karena mampu mengaktifkan jalur pensinyalan yang mengarah pada ekspresi faktor transkripsi EMT.

Hipoksia dalam tumor juga dapat mengaktifkan HIF-1 α , yang berkontribusi terhadap perubahan metabolik dan mendukung proses EMT. Selain itu, interaksi dengan fibroblas terkait kanker (*cancer-associated fibroblasts* (CAF)) dan sel imun dapat memperkuat sinyal pro-EMT. Dengan demikian, EMT pada OSCC merupakan hasil interaksi kompleks antara sel tumor dan lingkungan mikro sekitarnya, bukan semata-mata perubahan genetik intrinsik.

Penting untuk dipahami bahwa EMT bukanlah proses biner yang sepenuhnya mengubah sel epitel menjadi mesenkimal. Banyak sel tumor berada dalam kondisi “*partial EMT*”, yaitu mempertahankan sebagian sifat epitelial sekaligus memperoleh beberapa karakteristik mesenkimal. Keadaan ini justru dianggap memberikan keuntungan biologis karena memungkinkan fleksibilitas fenotipik.

Selain itu, dalam proses metastasis, sel tumor dapat mengalami proses kebalikan yang disebut *mesenchymal-epithelial transition* (MET) ketika membentuk koloni sekunder. Hal ini menunjukkan bahwa EMT bersifat plastis dan dinamis. Pada karsinoma oral, aktivasi EMT sering dikaitkan dengan invasi yang lebih agresif, peningkatan risiko metastasis ke kelenjar getah bening regional, serta prognosis yang kurang baik. Pada praktik IHC, kombinasi penurunan E-cadherin dan peningkatan vimentin sering digunakan sebagai indikator aktivitas EMT.

Bagi mahasiswa kedokteran gigi, pemahaman mengenai mekanisme EMT membantu menjelaskan mengapa lesi yang secara klinis tampak kecil dapat menunjukkan perilaku invasif yang signifikan. EMT memberikan dasar biologis bagi fenomena penyebaran lokal dan regional pada OSCC.

Secara keseluruhan, mekanisme EMT pada karsinoma oral berlangsung secara bertahap, dimulai dari gangguan adhesi sel, aktivasi program transkripsi mesenkimal, hingga akuisisi sifat invasif dan migratorik. Proses ini dipengaruhi oleh interaksi kompleks dengan mikro lingkungan tumor dan memiliki implikasi penting terhadap progresi penyakit serta prognosis pasien.

PERTANYAAN:

1. Bagaimana peran VEGF dan MVD dalam angiogenesis tumor, serta apa makna klinis peningkatan MVD terhadap prognosis kanker?
2. Jelaskan bagaimana MMPs, proses EMT, dan molekul adhesi bekerja secara terintegrasi dalam memfasilitasi invasi dan metastasis sel tumor.
3. Apa yang dimaksud dengan metastasis spesifik lokasi, dan bagaimana *marker* molekuler dapat digunakan untuk memprediksi arah penyebaran serta membantu penentuan strategi klinis?

RINGKASAN:

Marker angiogenesis, invasivitas, dan metastasis berperan penting dalam menilai kemampuan tumor untuk tumbuh, menembus jaringan sekitar, dan menyebar ke organ lain. Evaluasi marker melalui IHK memberikan gambaran mengenai agresivitas biologis tumor, potensi metastasis, serta nilai prognostik dan terapeutik. Pendekatan ini memungkinkan penilaian yang lebih komprehensif terhadap dinamika progresi tumor, tidak hanya berdasarkan morfologi, tetapi juga perubahan molekuler yang mendasarinya.

Marker angiogenesis seperti VEGF dan CD31 digunakan untuk menilai pembentukan pembuluh darah baru pada tumor. Ekspresi VEGF yang tinggi menunjukkan aktivitas angiogenesis yang meningkat dan berkaitan dengan pertumbuhan tumor yang lebih cepat serta risiko metastasis yang lebih besar. Penilaian MVD melalui *marker* endotel seperti CD31 memberikan ukuran kuantitatif tingkat vaskularisasi tumor dan sering berhubungan dengan prognosis yang lebih buruk. Peningkatan suplai vaskular ini tidak hanya mendukung pertumbuhan massa tumor, tetapi juga mempermudah akses sel tumor ke sirkulasi sistemik.

Marker invasivitas terutama melibatkan enzim proteolitik seperti MMP-2 dan MMP-9, yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler dan membran basal sehingga memungkinkan sel tumor menginvasi jaringan sekitarnya. Enzim proteolitik lain seperti uPA dan *cathepsins* juga mendukung proses invasi dan metastasis. Ekspresi *marker* proteolitik yang tinggi umumnya berkaitan dengan peningkatan agresivitas tumor dan stadium penyakit yang lebih lanjut, terutama pada area front invasi.

Marker metastasis dan EMT menggambarkan perubahan fenotip sel tumor yang meningkatkan kemampuan migrasi dan penyebaran. EMT pada karsinoma oral berlangsung secara bertahap. Pada tahap awal, terjadi penurunan ekspresi molekul adhesi epitelial seperti E-cadherin, yang menyebabkan berkurangnya kohesi antarsel dan gangguan integritas jaringan epitel. Selanjutnya, pada tahap transisi, terjadi aktivasi faktor transkripsi EMT seperti Snail, Slug, Twist, dan ZEB yang menekan gen epitelial dan menginduksi ekspresi gen mesenkimal. Fase ini ditandai dengan fenomena “*cadherin switch*”, yaitu penurunan E-cadherin disertai peningkatan N-cadherin serta peningkatan ekspresi vimentin. Perubahan ini disertai reorganisasi sitoskeleton dan peningkatan produksi enzim proteolitik yang memfasilitasi degradasi membran basal.

Pada tahap lanjut, sel tumor memperoleh sifat migratorik dan invasif yang lebih nyata. Sel menjadi lebih motil, kurang bergantung pada adhesi antarsel, serta lebih mampu menembus jaringan sekitar dan memasuki pembuluh darah atau limfatik. Proses ini sering ditemukan pada area *front* invasi tumor dan berkaitan dengan peningkatan risiko metastasis regional maupun jauh. Selain itu, sebagian sel tumor dapat berada dalam kondisi parsial EMT, yaitu mempertahankan sebagian karakteristik epitelial sekaligus memiliki sifat mesenkimal, yang memberikan fleksibilitas fenotipik dalam proses penyebaran dan kolonisasi di organ target.

Penurunan ekspresi E-cadherin serta peningkatan vimentin dan N-cadherin merupakan indikator penting EMT dan berkaitan dengan potensi metastasis yang lebih tinggi. Molekul adhesi lain, reseptor kemokin

seperti CXCR4, serta marker sel punca kanker seperti CD44 juga berperan dalam migrasi, *homing*, dan kolonisasi sel tumor di lokasi sekunder.

Selain itu, *marker* metastasis spesifik lokasi membantu mengidentifikasi asal tumor dan pola penyebaran, sedangkan *marker* serum dapat digunakan untuk pemantauan perkembangan penyakit dan respons terapi. Secara keseluruhan, kombinasi *marker* angiogenesis, invasivitas, dan metastasis termasuk evaluasi bertahap mekanisme EMT memberikan gambaran komprehensif mengenai progresi biologis tumor serta mendukung penentuan prognosis dan strategi terapi yang lebih terarah.

D. *Marker* Imun dan Imunomodulator dalam Microenvironment Tumor

Microenvironment tumor merupakan ekosistem biologis yang kompleks, terdiri atas sel tumor, sel imun, sel stroma, pembuluh darah, serta berbagai mediator molekuler. Interaksi antara komponen-komponen ini sangat menentukan perilaku biologis tumor, termasuk pertumbuhan, invasi, dan respons terhadap terapi. Evaluasi *marker* imun melalui praktik IHK memberikan gambaran mengenai status respon imun lokal dan mekanisme imunomodulasi yang terjadi di sekitar tumor.

1. Panel Sel Imun: CD3, CD4, CD8, CD20, CD68

Lingkungan mikro tumor tidak hanya terdiri dari sel kanker, tetapi juga berbagai jenis sel imun yang berinteraksi secara aktif dengan tumor. Kumpulan sel imun ini membentuk apa yang disebut *microenvironment* imun tumor, yang sangat memengaruhi pertumbuhan, invasi, dan respons tumor terhadap terapi. Untuk memahami komposisi sel imun dalam jaringan tumor, digunakan panel *marker* imun seperti CD3, CD4, CD8, CD20, dan CD68 melalui pemeriksaan IHK (Karpithiou, 2017).

Dalam praktik IHK, panel ini digunakan untuk mengidentifikasi jenis sel imun yang ada, menilai jumlahnya, serta melihat distribusinya di dalam jaringan. Sel imun dapat ditemukan di dalam massa tumor (intratumoral) atau di jaringan penunjang di sekitarnya (stroma). Perbedaan lokasi ini penting karena dapat memberikan informasi mengenai kekuatan respons imun terhadap tumor.

CD3 adalah *marker* yang menandai seluruh limfosit T. Jika

banyak sel CD3 positif ditemukan dalam jaringan tumor, hal ini menunjukkan adanya respons imun seluler yang aktif. Kepadatan sel T yang tinggi sering dikaitkan dengan kemampuan tubuh yang lebih baik dalam mengenali dan menyerang sel kanker.

CD4 merupakan *marker* untuk sel T *helper*. Sel ini berperan sebagai “koordinator” sistem imun karena membantu mengaktifkan sel imun lain melalui pelepasan zat sinyal yang disebut sitokin. Sel CD4 membantu sel B memproduksi antibodi dan meningkatkan aktivitas sel T sitotoksik serta makrofag. Namun, sebagian sel CD4 juga dapat bersifat menekan respons imun, sehingga interpretasinya harus mempertimbangkan konteks jaringan secara keseluruhan.

CD8 menandai sel T sitotoksik, yaitu sel imun yang secara langsung membunuh sel kanker. Sel CD8 dapat menginduksi kematian sel tumor melalui pelepasan enzim yang merusak sel target. Banyak penelitian menunjukkan bahwa infiltrasi sel CD8 yang tinggi dalam tumor sering berkaitan dengan prognosis yang lebih baik dan respons terapi yang lebih baik, terutama pada imunoterapi. Rasio antara CD4 dan CD8 juga sering dinilai untuk melihat keseimbangan sistem imun.

CD20 adalah *marker* sel B, yang berperan dalam produksi antibodi sebagai bagian dari imunitas humoral. Selain menghasilkan antibodi, sel B juga membantu presentasi antigen kepada sel T. Kehadiran sel CD20 dalam tumor dapat menunjukkan adanya respons imun adaptif yang aktif. *Marker* ini juga penting dalam diagnosis penyakit seperti limfoma sel B.

CD68 merupakan *marker* makrofag, yaitu sel imun bawaan yang

berfungsi melakukan fagositosis (memakan partikel asing dan sisa sel). Dalam tumor, makrofag disebut *tumor-associated macrophages* (TAMs). Makrofag dapat berperan ganda: sebagian membantu melawan tumor, tetapi sebagian lainnya justru dapat mendukung pertumbuhan tumor dan pembentukan pembuluh darah baru. Tingginya jumlah makrofag dalam tumor sering dikaitkan dengan proses peradangan kronis.

Secara keseluruhan, kombinasi *marker* CD3/CD4/CD8 menggambarkan respons imun seluler yang dimediasi oleh sel T, CD20 mencerminkan respons imun humoral oleh sel B, dan CD68 menunjukkan aktivitas makrofag sebagai bagian dari imunitas bawaan. Analisis gabungan panel ini memberikan gambaran menyeluruh tentang bagaimana sistem imun berinteraksi dengan tumor.

Dalam praktik klinis, profil infiltrasi sel imun memiliki nilai prognostik penting. Tumor dengan infiltrasi sel T sitotoksik yang tinggi umumnya memiliki hasil klinis yang lebih baik dan lebih responsif terhadap imunoterapi. Oleh karena itu, panel sel imun tidak hanya membantu diagnosis histopatologis, tetapi juga berperan dalam perencanaan terapi kanker modern.

3. PD-L1: Penilaian, Scoring, dan Implikasi Klinis

Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) merupakan protein imunomodulator yang berperan penting dalam interaksi antara sel tumor dan sistem imun (Girolami, 2021). PD-L1 diekspresikan pada permukaan sel tumor serta beberapa sel imun di *microenvironment* tumor, seperti makrofag dan limfosit. Melalui ikatan dengan reseptor

PD-1 pada sel T, PD-L1 bertindak sebagai mekanisme penghambat (*immune checkpoint*) yang menekan aktivitas imun antitumor. Mekanisme ini memungkinkan sel kanker menghindari deteksi dan destruksi oleh sistem imun.

Dalam era imunoterapi modern, ekspresi PD-L1 menjadi *biomarker* prediktif penting untuk menentukan kemungkinan respon pasien terhadap terapi *immune checkpoint inhibitors*. Oleh karena itu, penilaian PD-L1 melalui IHK tidak hanya bersifat diagnostik, tetapi juga memiliki implikasi terapeutik langsung.

a. Penilaian PD-L1 (Metodologi)

Penilaian ekspresi PD-L1 dilakukan melalui pemeriksaan IHK pada jaringan tumor yang diperoleh dari biopsi atau spesimen reseksi. Proses pra-analitik memiliki peran krusial dalam menentukan akurasi hasil. Jaringan harus segera difiksasi menggunakan formalin bufer netral 10% dengan waktu fiksasi yang adekuat (umumnya 6–48 jam). Fiksasi yang tidak optimal dapat menyebabkan degradasi antigen atau pewarnaan yang tidak konsisten, sehingga memengaruhi interpretasi hasil.

Spesimen yang dinilai harus mengandung jumlah sel tumor hidup yang cukup, umumnya minimal sekitar 100 sel tumor viabel. Area nekrosis, artefak kompresi, atau jaringan dengan kerusakan struktural sebaiknya dihindari dalam evaluasi. Selain itu, heterogenitas intratumor perlu diperhatikan, karena ekspresi PD-L1 dapat bervariasi antara area perifer dan sentral tumor, serta antara tumor primer dan lesi metastasis.

Berbagai klon antibodi PD-L1 yang telah divalidasi secara klinis meliputi 22C3, 28-8, SP142, dan SP263. Setiap klon memiliki karakteristik sensitivitas dan pola pewarnaan yang sedikit berbeda, serta sering dikaitkan dengan platform deteksi dan agen imunoterapi tertentu. Standardisasi prosedur laboratorium, termasuk kontrol kualitas internal dan eksternal, penting untuk menjamin reproduktibilitas hasil antar laboratorium.

Dalam interpretasi mikroskopik, ekspresi positif PD-L1 ditandai oleh pewarnaan membran parsial atau lengkap pada sel tumor. Pewarnaan sitoplasmik tanpa keterlibatan membran tidak dihitung sebagai ekspresi positif. Selain sel tumor, evaluasi juga dapat mencakup sel imun infiltratif seperti limfosit dan makrofag, terutama pada sistem *scoring* yang mempertimbangkan komponen *microenvironment* tumor. Penilaian harus dilakukan oleh pemeriksa terlatih dengan mempertimbangkan morfologi jaringan secara keseluruhan untuk menghindari salah interpretasi terhadap sel non-tumor.

b. Sistem Scoring PD-L1

Untuk menstandarkan evaluasi ekspresi PD-L1, digunakan dua sistem scoring utama, yaitu *Tumor Proportion Score* (TPS) dan *Combined Positive Score* (CPS) (Girolami, 2021). Kedua sistem ini dirancang untuk mengkuantifikasi ekspresi PD-L1 dengan pendekatan yang sedikit berbeda sesuai dengan jenis kanker dan konteks klinis. Sistem *scoring* dengan metode TPS dilakukan dengan cara mengukur persentase sel tumor hidup yang menunjukkan

pewarnaan membran PD-L1. Adapun rumus perhitungan TPS adalah sebagai berikut:

$$\text{TPS} = \frac{\text{jumlah sel tumor PD-L1 positif}}{\text{total sel tumor hidup}} \times 100\%$$

Dalam penelitian berbasis IHK, sistem *scoring* TPS berfokus secara eksklusif pada populasi sel tumor dan banyak digunakan pada kanker paru *non-small cell*. Penilaian dilakukan pada area tumor representatif dengan menghindari jaringan nekrotik dan artefak. Sedangkan sistem *scoring dengan metode* CPS memperhitungkan kontribusi sel tumor dan sel imun positif PD-L1, sehingga memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai interaksi tumor dengan *microenvironment* imun. Adapun rumus perhitungan CPS adalah sebagai berikut:

$$\text{CPS} = \frac{\text{Jumlah sel tumor} + \text{Limfosit} + \text{Makrofas PD-L1 positif}}{\text{Total sel tumor hidup}} \times 100$$

Nilai CPS secara teoritis dapat melebihi 100 karena memasukkan komponen sel imun. Sistem ini sering digunakan pada kanker lambung, urothelial, dan kanker kepala-leher. CPS dianggap lebih representatif pada tumor dengan infiltrasi imun yang signifikan, karena mencerminkan aktivitas imun lokal di sekitar tumor.

c. Interpretasi Skor

Hasil *scoring* PD-L1 umumnya diklasifikasikan menjadi beberapa kategori ekspresi:

1. Negatif atau sangat rendah: TPS < 1% atau CPS < 1

2. Ekspresi rendah-sedang: TPS 1–49%
3. Ekspresi tinggi: TPS $\geq 50\%$

Klasifikasi ini digunakan sebagai panduan untuk memperkirakan kemungkinan respons terhadap imunoterapi. Namun, interpretasi skor harus dilakukan dalam konteks klinis yang lebih luas. Ekspresi PD-L1 bersifat dinamis dan dapat dipengaruhi oleh faktor seperti inflamasi lokal, terapi sebelumnya, dan tekanan selektif dari sistem imun. Selain itu, PD-L1 bukan merupakan *biomarker* absolut. Sebagian pasien dengan ekspresi rendah tetap dapat merespons terapi imun, sementara tidak semua pasien dengan ekspresi tinggi menunjukkan respons yang optimal. Variabilitas ini mencerminkan kompleksitas interaksi antara tumor, sistem imun, dan *microenvironment* sekitarnya.

d. Implikasi Klinis

Penilaian PD-L1 memiliki implikasi langsung terhadap strategi terapi kanker modern. Tumor dengan ekspresi PD-L1 tinggi sering menunjukkan respons yang baik terhadap imunoterapi monoterapi dan dapat dipertimbangkan sebagai terapi lini pertama. Pada ekspresi rendah hingga sedang, imunoterapi biasanya dikombinasikan dengan kemoterapi atau terapi target untuk meningkatkan efektivitas. Interpretasi ekspresi PD-L1 perlu mempertimbangkan jenis spesimen, klon antibodi, platform pewarnaan, sistem *scoring*, serta indikasi terapi yang digunakan (Girolami, 2021).

Oleh karena itu, keputusan terapeutik tidak hanya bergantung pada skor PD-L1, tetapi juga mempertimbangkan faktor klinis lain seperti stadium penyakit, kondisi umum pasien, dan profil molekuler tumor.

Tantangan utama dalam evaluasi PD-L1 meliputi heterogenitas ekspresi antara tumor primer dan metastasis, serta variasi interpretasi antar pengamat. Untuk meningkatkan konsistensi, pendekatan *digital pathology* dan sistem analisis otomatis mulai dikembangkan. Metode alternatif seperti *Tumor Area Positivity* (TAP) dan teknik *double-IHK* juga sedang diteliti untuk meningkatkan akurasi dan objektivitas penilaian.

e. Variabilitas dan Tantangan dalam Evaluasi PD-L1

Meskipun sistem scoring PD-L1 telah dikembangkan untuk meningkatkan konsistensi interpretasi, evaluasi IHK tetap menghadapi sejumlah tantangan biologis dan teknis. Variabilitas ekspresi PD-L1 merupakan fenomena yang kompleks dan dapat terjadi pada berbagai tingkat, mulai dari variasi intratumoral hingga perbedaan antar spesimen pada pasien yang sama.

Secara biologis, ekspresi PD-L1 bersifat dinamis dan dipengaruhi oleh lingkungan mikro tumor. Aktivasi jalur inflamasi, khususnya melalui interferon- γ yang dilepaskan oleh sel T sitotoksik, dapat menginduksi ekspresi PD-L1 secara adaptif pada sel tumor. Fenomena ini dikenal sebagai *adaptive immune resistance*. Akibatnya, area tumor dengan infiltrasi limfosit yang tinggi sering menunjukkan ekspresi PD-L1 yang lebih kuat dibandingkan area

dengan infiltrasi minimal. Kondisi ini menimbulkan variasi spasial yang dapat memengaruhi hasil *scoring*.

Heterogenitas juga dapat terjadi antara tumor primer dan metastasis regional atau jauh. Beberapa studi menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 pada metastasis nodal dapat berbeda dari lesi primer, baik lebih tinggi maupun lebih rendah. Oleh karena itu, pemilihan lokasi biopsi memiliki implikasi klinis yang penting.

Dari aspek teknis, faktor pra-analitik seperti waktu fiksasi, jenis fiksatif, proses dehidrasi, serta penyimpanan blok parafin dapat memengaruhi kualitas antigen dan intensitas pewarnaan. Fiksasi yang terlalu singkat dapat menyebabkan degradasi antigen, sedangkan fiksasi terlalu lama berpotensi menurunkan reaktivitas epitop. Variasi ini dapat menghasilkan *underestimation* atau *overestimation* ekspresi PD-L1.

Perbedaan klon antibodi juga berkontribusi terhadap variabilitas hasil. Beberapa klon menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap ekspresi membran, sementara yang lain memiliki pola pewarnaan yang lebih restriktif. Selain itu, interpretasi visual terhadap pewarnaan membran parsial sering menjadi sumber perbedaan antar pengamat, terutama pada kasus dengan ekspresi rendah.

Variabilitas antar pengamat (*interobserver variability*) merupakan tantangan yang signifikan, khususnya pada kategori *cut-off* rendah seperti TPS $\geq 1\%$. Penilaian terhadap 1–5% sel positif memerlukan ketelitian tinggi dan pengalaman yang memadai. Untuk mengurangi bias subjektif, beberapa laboratorium menerapkan pembacaan ganda atau konsensus antar patolog.

Perkembangan teknologi *digital pathology* memungkinkan analisis citra berbasis algoritma untuk menghitung proporsi sel positif secara lebih objektif. Meskipun menjanjikan, sistem ini masih memerlukan validasi luas dan integrasi dengan penilaian morfologis manual untuk memastikan akurasi.

f. Konsep *Companion Diagnostic* dan Standardisasi Global

Dalam konteks terapi kanker modern, PD-L1 merupakan salah satu *biomarker* yang masuk dalam kategori *companion diagnostic*, yaitu pemeriksaan laboratorium yang secara spesifik digunakan untuk menentukan kelayakan pasien menerima terapi tertentu. Konsep ini menandai pergeseran paradigma dari pendekatan terapi empiris menuju terapi presisi berbasis *biomarker*.

Companion diagnostic dikembangkan bersamaan dengan uji klinis obat tertentu. Oleh karena itu, setiap klon antibodi PD-L1 sering kali divalidasi dalam konteks penggunaan agen imunoterapi spesifik dan pada jenis kanker tertentu. Hal ini menyebabkan adanya keterkaitan antara jenis antibodi, platform pewarnaan, sistem scoring, serta indikasi terapi yang diakui secara regulatori.

Standardisasi global menjadi aspek krusial dalam memastikan bahwa hasil pemeriksaan dapat direproduksi dan dibandingkan antar pusat layanan kesehatan. Program kontrol mutu eksternal (*external quality assurance*) berperan dalam menjaga konsistensi prosedur dan interpretasi. Tanpa standardisasi yang memadai, nilai prediktif PD-L1 sebagai *biomarker* dapat berkurang secara signifikan.

Selain itu, harmonisasi antar klon antibodi telah menjadi fokus penelitian, dengan tujuan menentukan apakah berbagai klon menghasilkan hasil yang sebanding atau memerlukan *cut-off* berbeda. Proses harmonisasi ini penting untuk meminimalkan kesenjangan akses terapi akibat perbedaan teknis laboratorium.

g. Ekspresi PD-L1 dalam Konteks OSCC

Pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut (OSCC), ekspresi PD-L1 mencerminkan interaksi kompleks antara sel tumor dan sistem imun lokal. Secara umum, peningkatan ekspresi PD-L1 pada OSCC dikaitkan dengan aktivitas inflamasi di sekitar tumor, terutama pada tumor dengan infiltrasi limfosit yang signifikan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekspresi PD-L1 lebih sering ditemukan pada OSCC dengan derajat diferensiasi sedang hingga buruk. Hubungan ini diduga berkaitan dengan instabilitas genetik yang lebih tinggi dan peningkatan beban neoantigen, yang pada gilirannya memicu respons imun dan induksi ekspresi PD-L1 sebagai mekanisme penghindaran imun.

Ekspresi PD-L1 pada OSCC juga dilaporkan berkorelasi dengan metastasis nodal regional. Tumor dengan skor CPS tinggi cenderung menunjukkan risiko keterlibatan kelenjar getah bening yang lebih besar. Selain itu, ekspresi PD-L1 pada area *front* invasi sering berasosiasi dengan aktivasi mekanisme EMT, yang menunjukkan bahwa proses invasi dan supresi imun dapat berlangsung secara paralel.

Interaksi antara PD-L1 dan sel T sitotoksik CD8+ menjadi faktor penting dalam menentukan prognosis. Pada sebagian

kasus, kombinasi infiltrasi CD8+ tinggi dan ekspresi PD-L1 tinggi dapat menunjukkan respons imun aktif yang sedang dihambat, sehingga berpotensi responsif terhadap imunoterapi. Sebaliknya, ekspresi PD-L1 rendah dengan infiltrasi limfosit minimal dapat mencerminkan tumor yang bersifat imunologis “dingin”.

h. Integrasi PD-L1 dengan *Biomarker* Imun Lain

Penilaian PD-L1 sebaiknya tidak dilakukan secara terpisah dari parameter imunologis lainnya. Respons terhadap imunoterapi dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk komposisi mikro lingkungan tumor, kepadatan dan fungsi sel T efektor, serta profil molekuler tumor secara keseluruhan.

Kepadatan *tumor-infiltrating lymphocytes* (TIL), khususnya sel T CD8+, sering digunakan sebagai indikator respons imun antitumor. Kombinasi antara ekspresi PD-L1 dan kepadatan TIL dapat memberikan gambaran mengenai status “*inflamed*” atau “*non-inflamed*” suatu tumor. Selain itu, beban mutasi tumor yang tinggi dapat meningkatkan pembentukan neoantigen, sehingga memicu respons imun yang lebih kuat. Status instabilitas mikrosatelit juga berkaitan dengan peningkatan imunogenisitas tumor.

Dalam konteks OSCC, integrasi antara PD-L1, *marker* EMT (seperti penurunan E-cadherin dan peningkatan vimentin), *marker* proliferasi (Ki-67), serta *marker* angiogenesis (VEGF) dapat memberikan gambaran biologis yang lebih komprehensif mengenai agresivitas tumor.

4. *Cytokine* dan Molekul *Soluble*: Deteksi *Indirect* via IHK

Cytokine dan berbagai molekul *soluble* merupakan komponen penting dalam tumor *microenvironment* yang mengatur komunikasi antara sel tumor, sel imun, dan sel stroma. Molekul-molekul ini mencakup interleukin (IL), *tumor necrosis factor* (TNF), *transforming growth factor-β* (TGF-β), *chemokine*, serta berbagai growth factor yang berperan dalam inflamasi, angiogenesis, imunosupresi, dan progresi tumor. Berbeda dengan *marker* struktural yang relatif stabil di dalam sel, *cytokine* bersifat dinamis, disekresikan ke ruang ekstraseluler, dan sering memiliki waktu paruh yang singkat. Oleh karena itu, deteksi langsung *cytokine* dalam jaringan melalui IHK memiliki tantangan tersendiri.

Dalam praktik histopatologi, IHK terhadap *cytokine* umumnya bersifat deteksi tidak langsung (*indirect detection*). Yang dinilai bukan hanya keberadaan *cytokine* itu sendiri, tetapi juga pola ekspresi reseptor, protein hilir (*downstream signaling proteins*), atau sel penghasil *cytokine*. Misalnya, ekspresi TGF-β dapat dikorelasikan dengan aktivasi jalur SMAD, sedangkan aktivitas interferon sering dinilai melalui ekspresi protein yang diinduksi interferon. Pendekatan ini memberikan gambaran fungsional mengenai aktivitas jalur sinyal dalam *microenvironment* tumor.

Beberapa *cytokine* yang sering diteliti dalam konteks tumor meliputi IL-6, IL-10, TNF-α, dan TGF-β. IL-6 berperan dalam proliferasi sel tumor dan resistensi terapi melalui aktivasi jalur JAK/STAT. IL-10 dan TGF-β dikenal sebagai *cytokine* imunosupresif yang membantu tumor menghindari pengawasan imun dengan menekan aktivitas

sel T efektor. Sebaliknya, *cytokine* proinflamasi seperti TNF- α dapat memiliki efek ganda, yaitu memicu inflamasi anti-tumor atau justru mendukung progresi tumor tergantung konteks biologisnya.

Dalam pemeriksaan IHK, ekspresi *cytokine* biasanya tampak sebagai pewarnaan sitoplasmik atau perinuklear pada sel tumor maupun sel imun infiltratif. Interpretasi hasil memerlukan perhatian terhadap distribusi spasial, misalnya apakah ekspresi dominan pada sel tumor, makrofag terkait tumor (*tumor-associated macrophages*), atau limfosit infiltratif. Pola distribusi ini memberikan informasi mengenai interaksi lokal antara tumor dan sistem imun.

Selain *cytokine*, berbagai molekul soluble lain seperti growth factor (misalnya VEGF, EGF), *chemokine* (CXCL12), dan mediator inflamasi juga dapat dinilai secara tidak langsung melalui IHK. Namun, karena sifatnya yang mudah berdifusi, evaluasi jaringan sering dikombinasikan dengan metode lain seperti ELISA, PCR, atau analisis proteomik untuk memperoleh gambaran kuantitatif yang lebih akurat. Dengan demikian, IHK berfungsi sebagai alat untuk menilai konteks morfologis dan lokasi ekspresi dalam jaringan.

Secara klinis, profil *cytokine* dalam *microenvironment* tumor memiliki implikasi penting terhadap prognosis dan respons terapi. Dominasi *cytokine* immunosupresif sering dikaitkan dengan lingkungan tumor yang “dingin” secara imunologis (*immune-cold tumor*), yang kurang responsif terhadap imunoterapi. Sebaliknya, lingkungan yang kaya *cytokine* pro-inflamasi dan infiltrasi sel imun aktif cenderung menunjukkan respon terapi yang lebih baik. Pemahaman mengenai jaringan sinyal *cytokine* juga menjadi dasar

pengembangan terapi target, seperti inhibitor jalur JAK/STAT atau antibodi terhadap TGF- β . Oleh karena itu, meskipun deteksi *cytokine* melalui IHK bersifat tidak langsung, informasi yang diperoleh tetap sangat berharga dalam memahami dinamika biologis tumor dan dalam merancang strategi terapi yang lebih personal.

5. Marker Regulasi Imun Lainnya dan Implikasi Terapeutik

Regulasi respons imun dalam mikroenvironment tumor tidak hanya melibatkan PD-1/PD-L1, tetapi juga berbagai *checkpoint* imun lain, sel regulator, serta mekanisme metabolik dan sitokin yang membentuk kondisi immunosupresif. Interaksi kompleks ini menentukan apakah sistem imun mampu mengeliminasi sel abnormal atau justru mengalami toleransi dan kelelahan fungsional (*immune exhaustion*). Evaluasi *marker* regulasi imun melalui IHK memungkinkan pemetaan status imunologis jaringan secara morfologis dan kuantitatif. Pemeriksaan ini penting dalam konteks terapi presisi, karena efektivitas imunoterapi sangat dipengaruhi oleh keseimbangan antara faktor immunostimulator dan immunosupresif.

a. CTLA-4: Regulator Negatif Aktivasi Awal Sel T

Regulasi respons imun merupakan proses yang sangat terkontrol untuk menjaga keseimbangan antara efektivitas pertahanan tubuh dan pencegahan kerusakan jaringan akibat respons yang berlebihan. Salah satu molekul kunci dalam mekanisme ini adalah CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*). CTLA-4 termasuk dalam kelompok *immune checkpoint* yang

berfungsi sebagai regulator negatif aktivasi sel T, khususnya pada fase awal respons imun di organ limfoid sekunder.

Berbeda dengan PD-1 yang bekerja terutama di jaringan perifer, CTLA-4 berperan pada tahap *priming* sel T, yaitu saat antigen pertama kali dipresentasikan oleh *Antigen Presenting Cell* (APC). Fungsi utama CTLA-4 adalah mencegah aktivasi sel T yang berlebihan, sehingga menjaga toleransi imun dan mencegah autoimunitas. Dalam konteks patologi, termasuk keganasan dan lesi kronis inflamasi, jalur ini dapat mengalami disfungsi atau dimanfaatkan untuk menghambat respons imun efektor.

Secara mekanistik, regulasi CTLA-4 dalam aktivasi sel T dapat dijelaskan melalui beberapa proses berikut:

1. Kompetisi Ligan dengan CD28

Aktivasi penuh sel T memerlukan dua sinyal: pengenalan antigen melalui TCR dan sinyal kostimulasi melalui interaksi CD28 dengan CD80/CD86 (B7) pada APC. CTLA-4 memiliki afinitas yang jauh lebih tinggi terhadap CD80/CD86 dibandingkan CD28. Karena itu, ketika CTLA-4 diekspresikan, ia akan lebih dahulu berikatan dengan molekul B7 dan menghambat sinyal kostimulasi positif.

2. Penghambatan Sinyal Kostimulasi

Dengan terblokirnya interaksi CD28-B7, sel T tidak memperoleh sinyal kostimulasi yang cukup untuk proliferasi dan diferensiasi optimal. Akibatnya, aktivasi sel T menjadi tereduksi.

3. Sinyal Inhibisi Intraseluler

Selain melalui kompetisi ligan, CTLA-4 juga mengirimkan

sinyal penghambatan langsung yang menurunkan produksi sitokin (seperti IL-2) dan menghambat proliferasi sel T.

4. Transendositosis Molekul B7

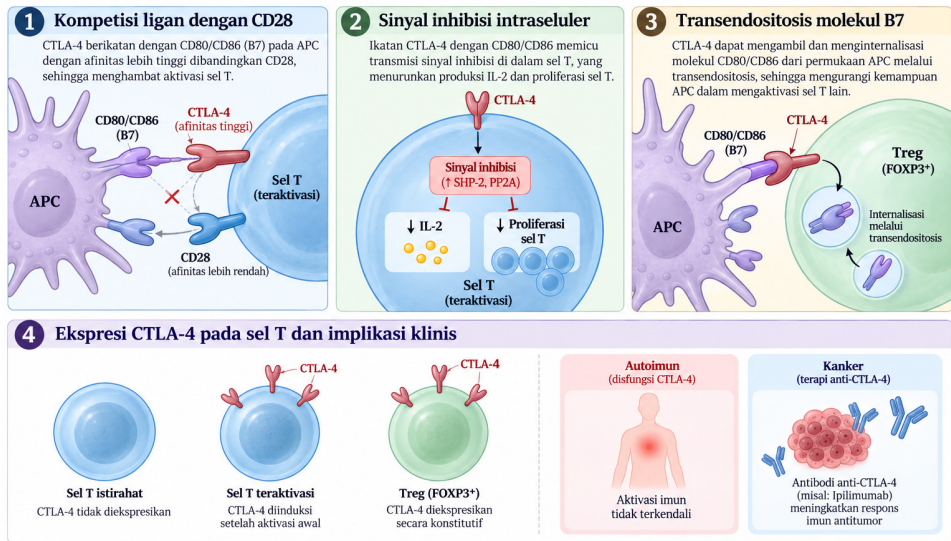
CTLA-4 mampu mengambil dan menginternalisasi molekul CD80/CD86 dari permukaan APC melalui proses transendositosis. Mekanisme ini mengurangi kemampuan APC dalam mengaktivasi sel T lain, sehingga memperkuat efek supresif secara lokal.

Dari segi ekspresi, CTLA-4 tidak ditemukan pada sel T dalam keadaan istirahat, tetapi diinduksi setelah aktivasi awal sebagai mekanisme umpan balik negatif. Sebaliknya, pada sel T regulator (Treg) yang mengekspresikan FOXP3, CTLA-4 diekspresikan secara konstitutif dan berperan penting dalam mempertahankan toleransi imun.

Secara klinis, disfungsi CTLA-4 dapat menyebabkan aktivasi imun yang tidak terkendali dan memicu penyakit autoimun. Dalam konteks kanker, jalur ini dapat berkontribusi pada penekanan respons antitumor. Oleh karena itu, antibodi monoklonal anti-CTLA-4 seperti Ipilimumab dikembangkan untuk menghambat fungsi CTLA-4 dan meningkatkan respons imun terhadap sel tumor. Strategi ini efektif pada beberapa jenis keganasan, meskipun berisiko menimbulkan efek samping imunologis akibat pelepasan mekanisme kontrol fisiologis.

Dengan demikian, CTLA-4 merupakan regulator sentral fase awal aktivasi sel T yang berfungsi sebagai “rem” molekuler sistem imun. Pemahaman terhadap ekspresi dan

fungsinya, termasuk melalui pemeriksaan IHK, memiliki nilai penting dalam interpretasi status imun jaringan serta dalam perencanaan terapi berbasis *checkpoint inhibitor*.



Gambar 12. Regulasi CTLA-4 dalam Aktivasi Sel T dan Implikasi Klinisnya.

Ilustrasi **Gambar 12** menunjukkan mekanisme penghambatan aktivasi sel T oleh CTLA-4 melalui empat tahapan utama: (1) kompetisi ligan antara CTLA-4 dan CD28 terhadap CD80/CD86 (B7) pada *antigen-presenting cell* (APC), (2) transmisi sinyal inhibisi intraseluler yang menurunkan produksi IL-2 dan proliferasi sel T, (3) proses transendositosis yang menghilangkan molekul B7 dari permukaan APC, serta (4) implikasi klinis pada kondisi autoimun dan terapi kanker berbasis *immune checkpoint inhibitor*.

Gambar tersebut menggambarkan peran sentral CTLA-4 sebagai molekul checkpoint imun yang berfungsi menjaga keseimbangan respons imun. Pada fase awal aktivasi sel T, APC menyajikan antigen melalui kompleks MHC kepada TCR pada sel T. Untuk mencapai aktivasi penuh, diperlukan sinyal kostimulatori melalui interaksi CD28 pada sel T dengan CD80/CD86 (B7) pada APC. CTLA-4, yang diekspresikan setelah aktivasi sel T dan secara konstitutif pada sel T regulator (Treg), memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap CD80/CD86 dibandingkan CD28. Akibatnya, CTLA-4 berkompetisi dan menghambat sinyal kostimulasi, sehingga menurunkan produksi IL-2 dan menghambat proliferasi sel T. Selain kompetisi ligan, CTLA-4 juga mengirimkan sinyal inhibisi intraseluler yang memperkuat efek supresif terhadap aktivasi sel T. Mekanisme tambahan berupa transendositosis memungkinkan CTLA-4 menarik molekul CD80/CD86 dari permukaan APC dan mendegradasinya, sehingga mengurangi kapasitas stimulasi APC terhadap sel T lainnya.

Secara klinis, gangguan regulasi jalur ini dapat menyebabkan dua konsekuensi utama. Aktivitas CTLA-4 yang berlebihan dapat menekan respons imun terhadap sel tumor, sedangkan defisiensi atau disfungsi CTLA-4 dapat memicu aktivasi sel T yang tidak terkendali dan berkontribusi pada penyakit autoimun. Oleh karena itu, penghambatan CTLA-4 melalui terapi *immune checkpoint* inhibitor dimanfaatkan dalam terapi kanker untuk “melepaskan rem” sistem imun dan meningkatkan respons antitumor.

b. LAG-3 dan TIM-3: *Marker Kelelahan Sel T*

Selain PD-1 dan CTLA-4, molekul *checkpoint* imun lain yang berperan penting dalam regulasi respons imun adalah LAG-3 dan TIM-3. Keduanya merupakan reseptor titik pemeriksaan imun (*immune checkpoint receptors*) yang diekspresikan pada permukaan sel T yang mengalami kelelahan (*T cell exhaustion*), yaitu kondisi disfungsional akibat stimulasi antigen kronis seperti pada kanker dan infeksi persisten. Dalam keadaan tersebut, sel T kehilangan kemampuan proliferasi optimal, produksi sitokin menurun, serta kapasitas sitotoksik melemah. LAG-3 dan TIM-3 berfungsi sebagai “rem imun” tambahan yang memperkuat supresi respons sel T. Ekspresi keduanya sering meningkat pada sel T yang menginfiltrasi tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL) dan biasanya muncul bersamaan dengan ekspresi PD-1, menandakan tingkat kelelahan sel T yang lebih berat atau bahkan terminal. Karena perannya dalam mempertahankan status disfungsional sel T, kedua molekul ini menjadi target utama dalam strategi imunoterapi kombinasi.

LAG-3 dan TIM-3 merupakan molekul *checkpoint* imun yang secara konsisten diasosiasikan dengan keadaan kelelahan sel T (*T cell exhaustion*), terutama pada kondisi stimulasi antigen kronis seperti kanker dan infeksi persisten. Berbeda dengan CTLA-4 yang dominan bekerja pada fase awal aktivasi sel T, kedua molekul ini lebih banyak ditemukan pada fase lanjut respons imun ketika sel T telah mengalami stimulasi berulang dan mulai kehilangan

kapasitas fungsionalnya. Ekspresi LAG-3 dan TIM-3 yang meningkat sering kali menandakan penurunan proliferasi, berkurangnya produksi sitokin efektor, serta melemahnya aktivitas sitotoksik.

1. LAG-3 (*Lymphocyte Activation Gene-3*)

LAG-3 adalah reseptor inhibitor yang secara struktural homolog dengan CD4 dan memiliki afinitas tinggi terhadap MHC kelas II. Selain berinteraksi dengan MHC kelas II, penelitian terbaru menunjukkan bahwa FGL1 juga berperan sebagai ligan fungsional yang memperkuat transmisi sinyal inhibisi. Melalui interaksi tersebut, LAG-3 mengirimkan sinyal penghambat intraseluler yang menekan aktivasi dan proliferasi sel T serta menurunkan produksi sitokin seperti IL-2 dan IFN- γ . Dalam konteks patologis, ekspresi LAG-3 meningkat secara signifikan pada sel T yang menginfiltrasi tumor (*tumor-infiltrating lymphocytes*, TIL). Molekul ini sering ditemukan diekspresikan bersama PD-1, yang mencerminkan keadaan kelelahan fungsional yang lebih dalam. Selain membatasi respons imun antitumor, LAG-3 juga berkontribusi terhadap fungsi sel T regulator tipe 1 (Tr1), sehingga memperkuat lingkungan imun yang tolerogenik dan mendukung mekanisme evasi imun oleh tumor.

2. TIM-3 (*T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain 3*)

TIM-3 merupakan reseptor *checkpoint* yang umumnya diasosiasikan dengan tahap lanjut kelelahan sel T, khususnya pada subset CD8⁺ sitotoksik. Molekul ini berikatan dengan ligan seperti Galectin-9 dan CEACAM1, yang kemudian memicu

jalur inhibisi dan memperparah disfungsi sel T. Ekspresi TIM-3 sering kali muncul bersamaan dengan LAG-3 dan PD-1, terutama pada mikroenvironment tumor kronis, dan kondisi ko-ekspresi ini menandai kelelahan terminal yang lebih sulit dipulihkan.

Secara fungsional, penghambatan jalur TIM-3 terbukti dapat meningkatkan kembali proliferasi dan produksi sitokin sel T, menunjukkan bahwa sebagian disfungsi tersebut masih bersifat *reversibel*. Hal ini menjadikan TIM-3 sebagai target terapeutik yang penting dalam strategi imunoterapi modern.

Dalam praktik klinis, ekspresi simultan beberapa checkpoint imun seperti PD-1, LAG-3, dan TIM-3 sering kali berkontribusi terhadap resistensi terhadap monoterapi anti-PD-1. Mekanisme ini terjadi karena ketika satu jalur inhibisi diblokade, jalur lain dapat berfungsi sebagai kompensasi untuk mempertahankan status supresif pada sel T. Oleh karena itu, pendekatan terapi kombinasi berkembang sebagai strategi yang lebih rasional.

Kombinasi seperti anti-LAG-3 bersama anti-PD-1 atau anti-TIM-3 bersama anti-PD-1 menunjukkan efektivitas yang lebih tinggi dalam memulihkan fungsi sel T dibandingkan monoterapi tunggal. Strategi ini memungkinkan pelepasan beberapa “rem imun” secara bersamaan pada tingkat regulasi yang berbeda, sehingga mengurangi kemungkinan kelelahan terminal yang *ireversibel* dan meningkatkan respons imun antitumor.

Dengan demikian, LAG-3 dan TIM-3 tidak hanya berperan sebagai penanda biologis kelelahan sel T, tetapi juga sebagai target terapeutik strategis dalam pengembangan imunoterapi kombinasi untuk berbagai keganasan.

c. IDO dan Regulasi Metabolik Imun

Selain regulasi berbasis reseptor checkpoint permukaan seperti PD-1, LAG-3, dan TIM-3, sistem imun juga dikendalikan oleh mekanisme metabolik yang berperan sebagai “*checkpoint*” non-klasik. Salah satu regulator terpenting dalam jalur ini adalah *Indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), suatu enzim yang berfungsi sebagai pengatur keseimbangan antara aktivasi imun dan toleransi melalui mekanisme metabolik.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) merupakan enzim kunci yang mengatur respons imun dengan mengkatalisis degradasi asam amino esensial triptofan menjadi kynurenin. Aktivitas ini menciptakan lingkungan immunosupresif melalui dua mekanisme utama: penurunan kadar triptofan lokal dan akumulasi metabolit turunan kynurenin. Depleksi triptofan menyebabkan terhambatnya proliferasi sel T dan sel NK karena kedua populasi tersebut sangat bergantung pada ketersediaan asam amino untuk aktivasi dan ekspansi klonal. Sementara itu, akumulasi kynurenin berkontribusi pada disfungsi sel imun efektor dan mendorong diferensiasi sel T regulator (Treg), suatu populasi yang memperkuat toleransi imun.

Secara molekuler, mekanisme IDO dapat dipahami sebagai kombinasi antara “kelaparan metabolik” dan sinyal regulatori aktif. Aktivitas IDO memicu kondisi kelaparan triptofan yang mengaktifasi jalur stres seluler, termasuk *General Control Nonderepressible 2* (GCN2), yang pada akhirnya menghentikan siklus sel limfosit. Pada saat yang sama, metabolit seperti kynurenin bertindak sebagai mediator bioaktif yang menghambat fungsi sel T efektor serta menurunkan ekspresi reseptor pengaktif sel NK, termasuk NKG2D. Dengan

demikian, metabolit hasil aktivitas IDO tidak hanya merupakan produk sampingan metabolik, tetapi juga berfungsi sebagai sinyal imunoregulator yang aktif membentuk respons imun.

Dalam konteks mikroenvironment tumor (*tumor microenvironment* (TME)), ekspresi IDO sering kali meningkat baik pada sel tumor maupun pada sel imun terkait tumor seperti sel dendritik dan makrofag. Peningkatan ini memungkinkan tumor menciptakan lingkungan yang menekan imunitas lokal, sehingga sel T sitotoksik dan sel NK kehilangan kemampuan efektifnya. Strategi ini dimanfaatkan tumor untuk menghindari deteksi dan eliminasi oleh sistem imun, sekaligus memperkuat dominasi populasi Treg yang mendukung toleransi imun terhadap antigen tumor.

Dari sudut pandang terapeutik, IDO dipandang sebagai “*metabolic checkpoint*” yang krusial. Penghambatan IDO melalui inhibitor spesifik telah terbukti dapat meningkatkan kembali aktivitas sitotoksik sel T dan sel NK, serta mengurangi dominasi Treg dalam TME. Oleh karena itu, IDO menjadi target potensial dalam strategi kombinasi imunoterapi, khususnya bersama *checkpoint* inhibitor seperti anti-PD-1 atau anti-CTLA-4, dengan tujuan melepaskan hambatan imun baik pada tingkat reseptor permukaan maupun metabolik.

Secara keseluruhan, IDO bertindak sebagai titik kontrol metabolik yang menghubungkan metabolisme seluler dengan regulasi imun. Perannya dalam mengatur keseimbangan antara imunitas dan toleransi, terutama pada kanker, menempatkannya

sebagai komponen sentral dalam paradigma baru imunoterapi berbasis integrasi *checkpoint* imun dan *checkpoint* metabolik.

d. FOXP3 dan Sel T Regulator (Treg)

Dalam sistem imun, keseimbangan antara aktivasi dan supresi merupakan prasyarat utama untuk mempertahankan homeostasis. Jika respons imun terlalu lemah, patogen dan sel tumor dapat berkembang tanpa kontrol; sebaliknya, jika respons terlalu kuat atau tidak terkontrol, dapat terjadi kerusakan jaringan dan autoimunitas. Pada titik inilah sel T regulator (Treg) memainkan peran sentral sebagai penjaga toleransi imun.

FOXP3 merupakan faktor transkripsi utama sekaligus penanda molekuler spesifik yang menentukan perkembangan dan fungsi sel T regulator. Sel Treg secara klasik diidentifikasi sebagai populasi $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, di mana ekspresi FOXP3 menjadi determinan utama identitas dan kapasitas supresifnya. Melalui regulasi transkripsi berbagai gen imunologis, FOXP3 mengarahkan program molekuler yang memungkinkan Treg menekan respons imun berlebih, menjaga toleransi diri, serta mempertahankan keseimbangan imunologis jangka panjang.

Secara fisiologis, sel Treg $Foxp3^+$ sangat penting untuk mencegah terjadinya autoimunitas dan membatasi peradangan kronis. Ekspresi FOXP3 memungkinkan Treg menghambat proliferasi sel T efektor dan menekan produksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-2 dan IFN- γ . Mekanisme supresi ini dapat

terjadi melalui berbagai jalur, termasuk sekresi sitokin anti-inflamasi (misalnya IL-10 dan TGF- β), konsumsi IL-2 melalui ekspresi CD25 yang tinggi, serta interaksi langsung dengan sel penyaji antigen untuk menurunkan kapasitas stimulasi mereka.

Dari sisi perkembangan, sel Treg FOXP3⁺ dapat berasal dari dua jalur utama. Sebagian berkembang di timus setelah pengenalan antigen diri dengan afinitas tertentu, yang dikenal sebagai *thymus-derived* Treg (tTreg). Populasi lainnya terbentuk di perifer dari sel T CD4⁺ naif yang mengalami diferensiasi menjadi peripheral Treg (pTreg) dalam kondisi imunologis tertentu, terutama di bawah pengaruh TGF- β dan lingkungan tolerogenik. Kedua populasi ini bekerja secara sinergis dalam menjaga toleransi imun sistemik maupun lokal.

Secara patologis, keseimbangan jumlah dan fungsi Treg sangat menentukan outcome imunologis. Kekurangan atau disfungsi FOXP3 menyebabkan gangguan regulasi imun yang berat dan berujung pada penyakit autoimun sistemik, menegaskan peran FOXP3 sebagai “*master regulator*” toleransi imun. Sebaliknya, peningkatan jumlah atau aktivitas Treg yang berlebihan, terutama di dalam mikroenvironment tumor, dapat membatasi imunitas antitumor dan mempermudah progresi kanker. Dalam konteks ini, Treg menjadi komponen penting dalam mekanisme evasi imun oleh tumor.

Selain itu, heterogenitas Treg semakin diakui melalui identifikasi beberapa subset berdasarkan ekspresi molekul tambahan seperti Helios dan Neuropilin-1 (Nrp1). Molekul-

molekul ini membantu membedakan asal-usul maupun stabilitas fungsional Treg. Stabilitas ekspresi FOXP3 sendiri menjadi faktor krusial, terutama dalam kondisi inflamasi. Ekspresi FOXP3 yang stabil mempertahankan kapasitas supresif Treg, sedangkan instabilitasnya dapat menyebabkan hilangnya fungsi regulatori dan bahkan konversi menjadi sel pro-inflamasi.

Dengan demikian, FOXP3 bukan sekadar penanda fenotipik, melainkan regulator transkripsi sentral yang menentukan identitas, stabilitas, dan fungsi supresif sel Treg. Dalam konteks kesehatan, ia menjaga toleransi dan mencegah autoimunitas; dalam konteks kanker, ia dapat berkontribusi pada imunosupresi yang menghambat respons antitumor. Pemahaman mendalam mengenai dinamika FOXP3 dan Treg menjadi landasan penting dalam pengembangan strategi imunoterapi yang bertujuan menyeimbangkan kembali respons imun secara presisi.

e. Marker Lain: TIGIT, VISTA, dan Molekul Ko-inhibitor Baru

Perkembangan imunoterapi kanker dalam satu dekade terakhir tidak lagi terbatas pada penghambat checkpoint generasi pertama seperti PD-1/PD-L1 dan CTLA-4. Meskipun terapi tersebut telah merevolusi tata laksana berbagai keganasan, sebagian pasien tetap tidak merespons atau mengalami resistensi sekunder. Tantangan ini mendorong eksplorasi generasi baru reseptor ko-inhibitor, termasuk TIGIT, VISTA, dan sejumlah molekul regulator lainnya, yang saat ini sedang diselidiki secara intensif. Target-target ini diharapkan mampu

mengatasi resistensi terapi sekaligus meningkatkan efektivitas imunoterapi pada “tumor dingin”, yaitu tumor dengan infiltrasi sel imun yang minimal dan respons inflamasi yang rendah.

1. TIGIT (*T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*)

TIGIT merupakan reseptor penghambat yang diekspresikan pada sel T, termasuk sel T efektor dan Treg, serta pada sel *Natural Killer* (NK). Molekul ini berperan penting dalam mengatur keseimbangan antara aktivasi dan inhibisi imun di lingkungan mikro tumor. Secara mekanistik, TIGIT berikatan dengan ligan CD155 (PVR) yang diekspresikan pada sel tumor maupun APC. Interaksi ini menghasilkan sinyal inhibisi yang menekan fungsi sitotoksik sel T dan sel NK. Selain itu, aktivasi jalur TIGIT juga dapat menghambat maturasi sel dendritik, sehingga memperlemah presentasi antigen dan memperkuat lingkungan imunosupresif.

Dalam konteks klinis, pemblokiran TIGIT sering dikombinasikan dengan terapi anti-PD-1 atau anti-PD-L1 untuk menghasilkan efek sinergis. Kombinasi ini, seperti penggunaan antibodi anti-TIGIT bersama anti-PD-1/PD-L1, menunjukkan peningkatan respons imun antitumor, terutama pada kanker paru-paru sel non-kecil (NSCLC). Pendekatan ini bertujuan melepaskan lebih dari satu jalur inhibisi secara simultan guna meningkatkan aktivitas sel efektor.

2. VISTA (*V-domain Ig Suppressor of T Cell Activation*)

VISTA merupakan regulator checkpoint negatif yang relatif baru dan memiliki pola ekspresi yang berbeda dibandingkan PD-1 atau TIGIT. Molekul ini diekspresikan secara luas pada sel hematopoietik, terutama pada populasi sel myeloid seperti makrofag dan sel dendritik, serta ditemukan dalam kadar tinggi pada mikroenvironment tumor. Fungsi utama VISTA adalah menekan proliferasi sel T dan produksi sitokin, sekaligus mempertahankan toleransi diri perifer. Dalam mikroenvironment tumor, ekspresi VISTA yang tinggi berkontribusi terhadap supresi imun lokal dan dapat menjadi mekanisme kompensasi setelah terapi anti-PD-1 atau anti-CTLA-4.

Secara terapeutik, penghambat VISTA sedang dikembangkan untuk mengatasi resistensi terhadap *checkpoint* inhibitor generasi pertama. Studi pra-klinis menunjukkan bahwa kombinasi anti-VISTA dengan anti-PD-1 dapat secara signifikan menurunkan pertumbuhan tumor, terutama pada keganasan dengan karakteristik immunosupresif kuat seperti kanker prostat dan pankreas.

f. Molekul Ko-inhibitor Baru Lainnya

Selain TIGIT dan VISTA, sejumlah molekul ko-inhibitor baru sedang diteliti pada tahap pra-klinis hingga uji klinis lanjutan. Molekul-molekul ini memperluas spektrum target imunoregulasi yang

dapat dimanfaatkan dalam strategi terapi kombinasi. Beberapa di antaranya meliputi:

1. LAG-3, yang telah memperoleh persetujuan klinis dalam kombinasi dengan anti-PD-1 dan terbukti meningkatkan survival pada melanoma.
2. TIM-3, yang berperan dalam kelelahan sel T dan sering diekspresikan bersamaan dengan PD-1 pada sel T yang mengalami stimulasi kronis.
3. CD112R (PVRIG), bagian dari sumbu TIGIT/CD155, yang turut berkontribusi dalam penghambatan aktivasi sel T.
4. BTLA (*B and T Lymphocyte Attenuator*), yang memiliki fungsi serupa dengan CTLA-4 dalam menekan aktivasi sel T pada fase awal respons imun.
5. TNFR2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 2*), target baru yang sedang diuji sebagai pendekatan untuk memodulasi populasi Treg dan meningkatkan respons imun terhadap tumor padat yang resisten.

Pemanfaatan *marker* baru ini, terutama melalui strategi kombinasi, bertujuan untuk menargetkan berbagai mekanisme supresi imun secara simultan. Pendekatan ini menjadi sangat penting bagi pasien yang tidak merespons atau mengalami resistensi terhadap terapi *checkpoint* generasi pertama. Dengan menghambat beberapa jalur regulasi sekaligus baik pada sel T efektor, sel NK, sel myeloid, maupun Treg diharapkan respons imun antitumor dapat diperkuat secara lebih komprehensif.

Secara konseptual, perkembangan ini menandai pergeseran paradigma dari “*single checkpoint blockade*” menuju pendekatan *multi-checkpoint* dan *multi-level immunomodulation*, yang

mengintegrasikan regulasi reseptor permukaan, metabolik, dan seluler dalam satu strategi terapi yang lebih presisi dan personal.

6. Peran Sel T Sitotoksik dalam Prognosis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut (OSCC)

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (*oral squamous cell carcinoma/OSCC*) merupakan keganasan yang tidak hanya ditentukan oleh karakteristik sel tumor itu sendiri, tetapi juga oleh interaksi kompleks antara sel tumor dan lingkungan mikro sekitarnya. Salah satu komponen penting dalam mikro lingkungan tumor adalah infiltrasi sel imun, khususnya sel T sitotoksik (*cytotoxic T lymphocytes/CTL*), yang umumnya mengekspresikan marker CD8. Kehadiran dan aktivitas sel T sitotoksik memiliki implikasi prognostik yang bermakna pada OSCC.

Sel T sitotoksik berperan sebagai efektor utama dalam respons imun adaptif terhadap sel yang mengalami transformasi ganas. Setelah mengenali antigen tumor yang dipresentasikan melalui molekul MHC kelas I pada permukaan sel neoplastik, sel T sitotoksik akan teraktivasi dan melepaskan molekul sitotoksik seperti perforin dan granzyme. Perforin membentuk pori pada membran sel target, sedangkan granzyme menginduksi apoptosis melalui aktivasi jalur kaspase. Mekanisme ini memungkinkan eliminasi selektif sel tumor tanpa merusak jaringan sehat di sekitarnya.

Pada OSCC, tingkat infiltrasi sel T sitotoksik dalam jaringan tumor sering dievaluasi melalui pemeriksaan IHK menggunakan antibodi terhadap CD8. Secara umum, kepadatan infiltrasi CD8+ yang tinggi

dalam stroma tumor maupun pada area intratumoral dikaitkan dengan respons imun yang lebih efektif terhadap pertumbuhan sel ganas. Beberapa studi menunjukkan bahwa pasien dengan infiltrasi sel T sitotoksik yang tinggi cenderung memiliki angka kelangsungan hidup yang lebih baik dibandingkan dengan pasien dengan infiltrasi rendah.

Konsep ini berkaitan dengan istilah “*tumor-infiltrating lymphocytes*” (TILs), yang menggambarkan keberadaan limfosit dalam jaringan tumor. Pada OSCC, distribusi TIL tidak hanya dinilai secara kuantitatif, tetapi juga secara topografis, yaitu apakah sel T berada di tepi invasi tumor (*invasive front*), di dalam massa tumor, atau terutama di stroma sekitarnya. Infiltrasi yang mencapai area intratumoral dan front invasi sering dianggap memiliki nilai prognostik yang lebih baik dibandingkan infiltrasi yang terbatas pada stroma perifer.

Meskipun demikian, keberadaan sel T sitotoksik tidak selalu menjamin kontrol tumor yang efektif. Sel tumor dapat mengembangkan berbagai mekanisme evasi imun, seperti penurunan ekspresi MHC kelas I atau peningkatan ekspresi molekul *checkpoint* imun, termasuk PD-L1. Interaksi antara PD-L1 pada sel tumor dan PD-1 pada sel T dapat menghambat fungsi efektor sel T sitotoksik, menyebabkan keadaan yang dikenal sebagai “*exhaustion*” atau kelelahan sel T. Dalam kondisi ini, meskipun infiltrasi CD8+ tinggi, aktivitas sitotoksiknya dapat berkurang.

Oleh karena itu, interpretasi peran sel T sitotoksik dalam prognosis OSCC perlu mempertimbangkan konteks mikro lingkungan imun secara keseluruhan. Kombinasi antara kepadatan CD8+, ekspresi PD-L1, serta keberadaan sel imun regulator

seperti sel T regulator (Treg) dapat memberikan gambaran yang lebih komprehensif mengenai status imunologis tumor.

Dari sudut pandang klinis, pemahaman tentang peran sel T sitotoksik memiliki implikasi terapeutik. Terapi imun berbasis checkpoint inhibitor, seperti antibodi terhadap PD-1 atau PD-L1, bertujuan untuk mengembalikan fungsi sel T sitotoksik yang terhambat. Pada pasien OSCC tertentu, terapi ini menunjukkan manfaat terutama pada tumor dengan profil imunogenik dan infiltrasi limfosit yang memadai.

Bagi mahasiswa kedokteran gigi, pemahaman mengenai peran sel T sitotoksik dalam OSCC penting karena kanker rongga mulut sering pertama kali terdeteksi di praktik kedokteran gigi. Pengetahuan mengenai faktor prognostik, termasuk aspek imunologis, membantu dalam memahami variasi perjalanan penyakit antar pasien. Dengan demikian, OSCC tidak lagi dipandang semata-mata sebagai proliferasi sel epitel ganas, tetapi sebagai hasil interaksi dinamis antara sel tumor dan sistem imun inang.

Secara keseluruhan, infiltrasi sel T sitotoksik CD8+ yang adekuat pada OSCC umumnya berkorelasi dengan prognosis yang lebih baik, meskipun efektivitasnya dapat dipengaruhi oleh mekanisme supresi imun lokal. Pendekatan integratif yang menggabungkan parameter histopatologis klasik dengan evaluasi imunologis memberikan dasar yang lebih komprehensif dalam menilai prognosis dan strategi terapi pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

PERTANYAAN:

1. Jelaskan fungsi panel marker imun CD3, CD4, CD8, CD20, dan CD68 dalam evaluasi *microenvironment* tumor melalui IHK!
2. Apa perbedaan antara TPS dan CPS dalam penilaian ekspresi PD-L1?
3. Mengapa deteksi *cytokine* melalui IHK umumnya bersifat tidak langsung, dan bagaimana pendekatan yang digunakan untuk menilainya?

RINGKASAN:

Microenvironment tumor merupakan sistem kompleks yang terdiri dari sel tumor, sel imun, sel stroma, dan mediator molekuler yang bersama-sama memengaruhi pertumbuhan tumor, invasi, dan respons terapi. Pemeriksaan IHK memungkinkan evaluasi status imun lokal serta mekanisme imunomodulasi di sekitar tumor.

Panel sel imun (CD3, CD4, CD8, CD20, CD68) digunakan untuk menilai komposisi dan distribusi sel imun dalam jaringan tumor. CD3 mencerminkan total sel T, CD4 menunjukkan sel T helper, CD8 menandai sel T sitotoksik yang berhubungan dengan prognosis lebih baik, CD20 menunjukkan respons imun humoral oleh sel B, dan CD68 menggambarkan aktivitas makrofag terkait tumor. Profil infiltrasi sel imun memiliki nilai prognostik dan membantu menentukan respons terhadap imunoterapi.

PD-L1 merupakan *biomarker* imunomodulator penting yang berfungsi sebagai *immune checkpoint* melalui interaksi dengan PD-1 pada sel T. Ekspresi PD-L1 dinilai dengan metode IHK menggunakan sistem scoring seperti *Tumor Proportion Score* (TPS) dan *Combined Positive Score* (CPS), yang berperan dalam menentukan kemungkinan respons terhadap terapi *checkpoint inhibitor*.

Cytokine dan molekul *soluble* seperti IL-6, IL-10, TNF- α , dan TGF- β mengatur komunikasi antara sel tumor dan sistem imun. Deteksinya melalui IHK umumnya bersifat tidak langsung dengan menilai reseptor atau protein jalur sinyal terkait. Profil *cytokine* membantu menggambarkan kondisi *microenvironment* tumor apakah bersifat imunosupresif atau

proinflamasi, yang berhubungan dengan prognosis dan respons terapi.

Selain PD-L1, berbagai *marker* regulasi imun lainnya juga berperan penting. CTLA-4 menghambat aktivasi awal sel T, sedangkan LAG-3 dan TIM-3 merupakan penanda kelelahan sel T yang berhubungan dengan resistensi imunoterapi. IDO berfungsi sebagai *checkpoint* metabolik yang menekan respons imun melalui degradasi triptofan, sedangkan FOXP3 merupakan marker sel T regulator yang menjaga toleransi imun tetapi dapat mendukung evasi imun tumor.

Secara keseluruhan, evaluasi marker imun dan imunomodulator melalui IHK memberikan gambaran menyeluruh mengenai interaksi antara tumor dan sistem imun serta berperan penting dalam diagnosis, prognosis, dan pemilihan terapi kanker modern.

BAB III

Aplikasi Klinis IHK dan Peran Dokter Gigi dalam Diagnosis dan Manajemen

TUJUAN PEMBELAJARAN :

Mahasiswa memahami aplikasi klinis teknik IHK dalam bidang kedokteran gigi, khususnya dalam diagnosis, penentuan prognosis, serta pemilihan terapi pada lesi dan tumor rongga mulut, sehingga mampu mengaitkan hasil pemeriksaan molekuler dengan pengambilan keputusan klinis secara rasional dan berbasis bukti.

CAPAIAN PEMBELAJARAN:

Mahasiswa mampu menjelaskan peran IHK dalam praktik kedokteran gigi, termasuk dalam membantu diagnosis lesi oral, interpretasi biomarker tumor, serta kontribusi dokter gigi dalam proses rujukan, penatalaksanaan, dan pemantauan pasien berbasis pemeriksaan molekuler.

A. Dari Hasil IHK ke Rencana Perawatan: Prinsip Kolaborasi

IHK tidak hanya berfungsi sebagai alat diagnostik tambahan, tetapi telah berkembang menjadi instrumen penting dalam pengambilan keputusan klinis, khususnya pada keganasan kepala dan leher. Dalam konteks

kedokteran gigi terutama bedah mulut dan patologi oral hasil IHK berperan dalam menentukan agresivitas lesi, kebutuhan terapi tambahan, serta strategi rujukan yang tepat. Oleh karena itu, pemahaman terhadap interpretasi hasil IHK menjadi kompetensi penting bagi dokter gigi yang terlibat dalam tata laksana lesi pra-maligna maupun maligna di rongga mulut. Translasi Hasil IHK ke dalam rencana perawatan klinis menuntut pendekatan multidisipliner. Dokter gigi, ahli patologi anatomi, ahli bedah kepala-leher, onkolog medik, dan radioterapis harus bekerja secara kolaboratif untuk memastikan bahwa temuan biomarker diterjemahkan secara tepat ke dalam strategi terapi yang optimal.

Hasil IHK sering kali memberikan informasi mengenai tipe histologis, derajat diferensiasi, aktivitas proliferasi, status margin, serta ekspresi *marker* prognostik atau prediktif terapi (Zlobec, 2008; Alshammari, 2025; Thavarajah, 2025). Informasi ini tidak berdiri sendiri, melainkan harus dikorelasikan dengan temuan klinis, radiologis, dan stadium penyakit. Prinsip kolaborasi ini bertujuan untuk menghasilkan keputusan berbasis bukti yang individual dan terpersonalisasi bagi setiap pasien.

1. Interpretasi Hasil untuk Keputusan Bedah Lokal

Interpretasi hasil IHK dalam konteks bedah lokal maupun regional memiliki peran krusial dalam memetakan karakteristik biologis tumor secara spesifik. Informasi ini digunakan untuk menentukan operabilitas, luas sayatan (*margin*), serta kebutuhan terapi tambahan. IHK melengkapi pemeriksaan dasar Hematoxylin

& Eosin (H&E) dengan mendeteksi ekspresi protein spesifik pada sel tumor, sehingga memberikan dimensi molekuler yang tidak dapat diperoleh hanya dari morfologi jaringan.

Secara klinis, hasil IHC membantu menentukan sub tipe tumor dan perilaku biologisnya. Penentuan karakteristik ini penting karena setiap sub tipe memiliki implikasi berbeda terhadap strategi pembedahan. Sebagai ilustrasi pada kanker payudara, ekspresi reseptor hormon seperti ER dan PR yang positif menunjukkan kemungkinan respons terhadap terapi hormon, sehingga terapi sistemik dapat dipertimbangkan sebelum atau sesudah tindakan bedah. Ekspresi HER2 yang positif menandakan tumor dengan sifat lebih agresif dan risiko kekambuhan lebih tinggi, sehingga memerlukan terapi target tambahan selain pembedahan. Sementara itu, indeks proliferasi tinggi seperti Ki-67 $\geq 20\%$ mengindikasikan aktivitas mitosis yang cepat, yang dapat mendorong pendekatan bedah dengan margin yang lebih luas untuk meminimalkan risiko residu tumor. Pada kanker lain, marker seperti CD10 atau CK19 dapat membantu membedakan asal tumor primer dari metastasis, yang secara langsung memengaruhi rencana operasi.

Dalam hal operabilitas, hasil IHC dapat membantu menilai apakah tumor masih terlokalisasi dan memungkinkan reseksi kuratif. Jika ekspresi marker tertentu mengindikasikan penyakit sistemik atau metastasis luas, maka strategi terapi dapat bergeser dari bedah radikal menuju pendekatan sistemik seperti kemoterapi atau imunoterapi. Dengan demikian, IHC berkontribusi dalam pengambilan keputusan apakah operasi

merupakan pilihan utama atau bagian dari strategi multimodal.

Manajemen margin operasi juga sangat dipengaruhi oleh interpretasi IHC. Pada prosedur intraoperatif seperti frozen section, teknik IHC cepat (*rapid IHC*) dapat digunakan untuk mengevaluasi apakah batas sayatan bebas dari sel tumor. Jika pada margin ditemukan sel positif terhadap *marker* epitel tertentu (misalnya sitokeratin/CK), maka tindakan re-eksisi perlu dilakukan untuk memastikan pengangkatan tumor secara menyeluruh. Selain itu, IHC membantu membedakan sel tumor dari jaringan inflamasi atau jaringan reaktif di sekitar margin, sehingga meningkatkan akurasi evaluasi bedah.

Dalam laporan IHC, beberapa komponen utama menjadi dasar interpretasi klinis. Intensitas pewarnaan menggambarkan tingkat ekspresi antigen target, yang dapat dinilai sebagai kuat, sedang, atau lemah. Persentase sel positif menunjukkan proporsi sel tumor yang mengekspresikan *marker* tertentu. Pada beberapa keganasan, digunakan skor kombinasi yang menggabungkan intensitas dan persentase sel positif untuk menentukan kategori risiko atau agresivitas tumor. Pendekatan ini memberikan gambaran kuantitatif yang lebih objektif dalam mendukung keputusan terapeutik.

Dampak akhir dari interpretasi IHC terhadap tindakan bedah dapat berupa pemilihan prosedur konservatif atau radikal. Pada tumor dengan profil agresivitas rendah dan margin yang dapat dicapai secara adekuat, pendekatan konservatif mungkin cukup. Sebaliknya, pada tumor dengan indeks proliferasi tinggi atau *marker* agresivitas positif, pendekatan bedah yang lebih luas sering

kali dipertimbangkan untuk mengurangi risiko kekambuhan lokal.

Namun demikian, penting untuk menekankan bahwa hasil IHC tidak boleh diinterpretasikan secara terpisah. Keputusan klinis harus didasarkan pada integrasi antara temuan klinis, radiologis, histopatologi konvensional (H&E), serta diskusi dalam tim multidisipliner onkologi. Waktu tunggu hasil IHC yang umumnya berkisar beberapa hari hingga sekitar satu hingga dua minggu juga perlu diperhitungkan dalam perencanaan terapi agar tidak menunda penanganan yang optimal.

2. Peran IHC dalam Menentukan Terapi Adjuvan

Setelah tindakan bedah dilakukan, tantangan berikutnya dalam manajemen onkologi adalah menentukan apakah pasien memerlukan terapi tambahan (terapi adjuvan) untuk menurunkan risiko kekambuhan lokal maupun metastasis jauh. Pada tahap ini, IHC memainkan peran penting dalam mengidentifikasi karakter biologis tumor yang tidak selalu tampak pada evaluasi morfologis rutin dengan pewarnaan Hematoxylin & Eosin (H&E). Melalui deteksi ekspresi protein spesifik, IHC membantu mengklasifikasikan risiko, memprediksi respons terapi, serta memilih jenis terapi adjuvan yang paling sesuai.

Secara umum, terapi adjuvan dalam onkologi kepala-leher dan rongga mulut dapat berupa radioterapi, kemoterapi, terapi target, atau imunoterapi. Keputusan untuk memberikan terapi tambahan didasarkan pada kombinasi faktor klinis (stadium TNM), status *margin*

operasi, invasi perineural atau vaskular, serta profil *biomarker* tumor. Dalam konteks ini, IHC berfungsi sebagai jembatan antara karakteristik molekuler tumor dan strategi terapeutik yang dipersonalisasi.

Salah satu aspek terpenting adalah penilaian indeks proliferasi tumor. *Marker* seperti Ki-67 mencerminkan fraksi sel yang sedang aktif membelah. Ekspresi Ki-67 yang tinggi menunjukkan potensi pertumbuhan cepat dan risiko kekambuhan yang lebih besar. Pada kondisi tersebut, radioterapi atau kemoradioterapi pascaoperasi sering dipertimbangkan meskipun margin bedah telah dinyatakan bebas tumor. Dengan demikian, Ki-67 tidak hanya berperan sebagai indikator agresivitas, tetapi juga sebagai dasar rasional untuk intensifikasi terapi adjuvan. Selain proliferasi, ekspresi protein terkait diferensiasi dan stabilitas genom juga berpengaruh. Misalnya, overekspresi atau mutasi p53 dapat mengindikasikan gangguan mekanisme kontrol siklus sel, yang berkorelasi dengan prognosis lebih buruk. Dalam beberapa studi, profil p53 abnormal dikaitkan dengan peningkatan risiko kekambuhan lokal, sehingga mendukung pertimbangan radioterapi tambahan.

Dalam era terapi target, peran IHC semakin strategis. Ekspresi reseptor faktor pertumbuhan seperti EGFR pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher dapat menjadi dasar penggunaan terapi target seperti inhibitor EGFR sebagai bagian dari terapi kombinasi dengan radioterapi. Dengan demikian, IHC memungkinkan pendekatan yang lebih spesifik dibandingkan kemoterapi konvensional yang bersifat nonselektif. Lebih lanjut, evaluasi

ekspresi PD-L1 melalui IHK telah menjadi komponen penting dalam menentukan kelayakan pasien untuk imunoterapi berbasis *checkpoint* inhibitor. Pada pasien dengan ekspresi PD-L1 tinggi atau pada kasus kekambuhan/metastasis, imunoterapi dapat dipertimbangkan sebagai terapi adjuvan atau lini lanjutan. Penilaian ini sering menggunakan sistem skor seperti *Tumor Proportion Score* (TPS) atau *Combined Positive Score* (CPS), yang membantu memprediksi kemungkinan respons terhadap terapi anti-PD-1/PD-L1.

Peran IHK juga meluas pada identifikasi faktor risiko mikroenvironment tumor. Misalnya, kepadatan infiltrasi limfosit CD8⁺ atau dominasi sel imun supresif dapat memberikan gambaran mengenai potensi respons terhadap terapi imun atau kebutuhan pendekatan kombinasi. Dalam beberapa kasus, ekspresi biomarker tertentu dapat menandakan resistensi terhadap terapi tunggal sehingga mendorong penggunaan strategi multimodal.

Bagi dokter gigi yang terlibat dalam perawatan pasien kanker rongga mulut, pemahaman terhadap implikasi hasil IHK sangat penting dalam tahap pascaoperasi. Dokter gigi tidak hanya berperan dalam pemantauan penyembuhan luka dan rehabilitasi fungsi oral, tetapi juga dalam edukasi pasien mengenai kebutuhan terapi tambahan serta potensi efek samping seperti mukositis radiasi, xerostomia, atau osteoradionekrosis. Dengan memahami dasar molekuler keputusan terapi adjuvan, dokter gigi dapat berpartisipasi aktif dalam diskusi tim multidisipliner dan meningkatkan koordinasi perawatan.

Namun demikian, penting untuk ditekankan bahwa hasil

IHK tidak boleh menjadi satu-satunya dasar penentuan terapi adjuvan. Interpretasi harus dilakukan secara integratif dengan mempertimbangkan stadium klinis, kondisi umum pasien, komorbiditas, serta preferensi pasien. Diskusi dalam forum tumor board atau tim onkologi terpadu menjadi langkah krusial untuk memastikan bahwa terapi tambahan yang diberikan benar-benar memberikan manfaat klinis maksimal dengan risiko yang proporsional. Secara keseluruhan, IHK berperan sebagai alat stratifikasi risiko dan prediksi respons terapi yang mendukung konsep *precision medicine*. Melalui identifikasi biomarker proliferasi, reseptor pertumbuhan, *checkpoint* imun, dan karakter mikroenvironment tumor, IHK membantu mengarahkan keputusan terapi adjuvan yang lebih individual, rasional, dan berbasis bukti.

3. Pemantauan Respon Terapi Menggunakan IHK

Dalam manajemen keganasan kepala-leher dan rongga mulut, keberhasilan terapi tidak hanya ditentukan oleh tindakan awal (bedah, radioterapi, atau terapi sistemik), tetapi juga oleh kemampuan klinisi dalam mengevaluasi respons tumor secara objektif. Pada tahap inilah IHK memiliki peran strategis sebagai alat pemantauan biologis terhadap perubahan yang terjadi pada jaringan tumor setelah terapi.

Secara konvensional, respons terapi dinilai melalui pemeriksaan klinis dan radiologis, seperti pengurangan ukuran massa tumor atau tidak ditemukannya lesi residu pada pencitraan. Namun, perubahan morfologi saja sering kali tidak cukup untuk menggambarkan dinamika molekuler yang mendasari respons atau

resistensi terapi. IHC memungkinkan evaluasi ekspresi biomarker spesifik sebelum dan sesudah terapi, sehingga memberikan gambaran yang lebih mendalam mengenai aktivitas proliferasi, status apoptosis, perubahan mikroenvironment imun, serta adaptasi molekuler tumor (Ramos-Vara, 2014; Zlobec, 2008).

Salah satu parameter penting yang dapat dipantau adalah indeks proliferasi, misalnya melalui marker Ki-67. Penurunan signifikan ekspresi Ki-67 setelah kemoterapi atau radioterapi menunjukkan berkurangnya fraksi sel yang aktif membelah, yang secara umum dikaitkan dengan respons terapi yang baik. Sebaliknya, persistensi atau peningkatan ekspresi Ki-67 pascaterapi dapat mengindikasikan resistensi tumor dan potensi kekambuhan dini. Selain proliferasi, marker terkait apoptosis dan kerusakan DNA juga dapat dievaluasi. Perubahan ekspresi p53 atau protein regulator siklus sel setelah terapi dapat memberikan informasi mengenai efektivitas agen sitotoksik dalam menginduksi kematian sel tumor. Pada beberapa kasus, terapi dapat menyeleksi klon sel tumor dengan mutasi tertentu, sehingga profil IHC pascaterapi dapat berbeda dibandingkan saat diagnosis awal. Perubahan ini penting untuk dipahami karena dapat memengaruhi pilihan terapi lanjutan.

Dalam era imunoterapi, pemantauan respons menggunakan IHC menjadi semakin relevan. Evaluasi ulang ekspresi PD-L1, densitas infiltrasi limfosit CD8⁺, atau perubahan populasi sel imun supresif dalam mikroenvironment tumor dapat membantu menentukan apakah terapi checkpoint inhibitor efektif atau perlu

disesuaikan. Misalnya, peningkatan infiltrasi CD8⁺ pascaterapi dapat mencerminkan aktivasi respons imun antitumor, sedangkan dominasi sel T regulator (FOXP3⁺) atau makrofag tipe M2 dapat menandakan lingkungan yang tetap imunosupresif. IHK juga berperan dalam membedakan antara jaringan parut pascaterapi dan tumor residual. Setelah radioterapi atau kemoradioterapi, jaringan sering menunjukkan fibrosis, inflamasi kronis, dan perubahan morfologi sel yang dapat menyerupai keganasan. Dengan menggunakan marker epitel seperti sitokeratin, IHK membantu memastikan apakah sel yang ditemukan masih merupakan sel tumor viabel atau hanya perubahan reaktif. Hal ini penting untuk menghindari *overtreatment* akibat salah interpretasi.

Dalam kasus kekambuhan, pemeriksaan ulang IHK dapat mengungkap perubahan fenotip tumor (*tumor evolution*). Tumor yang awalnya menunjukkan ekspresi biomarker tertentu dapat kehilangan atau mengubah ekspresinya setelah paparan terapi. Fenomena ini, yang dikenal sebagai *selective pressure*, menjelaskan mengapa sebagian pasien mengalami resistensi sekunder terhadap terapi target atau imunoterapi. Oleh karena itu, re-biopsi dan evaluasi IHK ulang sering kali diperlukan sebelum memulai terapi lini berikutnya.

Bagi dokter gigi yang terlibat dalam perawatan pasien kanker rongga mulut, pemantauan respons terapi memiliki implikasi praktis yang signifikan. Pemeriksaan klinis rutin pada mukosa oral dapat mengidentifikasi lesi residual atau area mencurigakan yang memerlukan biopsi ulang. Pemahaman

terhadap interpretasi hasil IHC memungkinkan dokter gigi untuk berperan aktif dalam mendeteksi dini kekambuhan lokal, mengarahkan rujukan tepat waktu, serta memberikan edukasi kepada pasien mengenai rekam medis penyakitnya.

Selain itu, pemantauan biomarker juga membantu dalam menilai efek jangka panjang terapi. Misalnya, perubahan kronis pada jaringan akibat radiasi dapat dipantau secara histologis dan IHC untuk membedakan komplikasi terapi dari rekurensi tumor. Pendekatan ini sangat penting dalam menjaga keseimbangan antara kewaspadaan onkologis dan kualitas hidup pasien. Namun demikian, penggunaan IHC sebagai alat pemantauan memiliki keterbatasan. Variabilitas teknik, heterogenitas tumor, serta perubahan temporal ekspresi biomarker dapat memengaruhi interpretasi hasil. Oleh karena itu, evaluasi harus dilakukan secara terstandarisasi dan dikorelasikan dengan temuan klinis serta radiologis. Diskusi dalam tim multidisipliner tetap menjadi landasan utama dalam menentukan makna klinis perubahan biomarker yang ditemukan.

Secara keseluruhan, IHC dalam pemantauan respons terapi berfungsi sebagai alat evaluasi dinamis yang mencerminkan interaksi antara terapi dan biologi tumor. Melalui analisis perubahan proliferasi, apoptosis, serta komposisi mikroenvironment imun, IHC membantu klinisi memahami apakah terapi berhasil, perlu dimodifikasi, atau diganti. Dalam kerangka *precision medicine*, pendekatan ini mendukung pengambilan keputusan yang lebih adaptif dan individual, sehingga meningkatkan peluang kontrol penyakit jangka panjang.

4. Rujukan dan Jaringan Layanan Onkologi Kepala-Leher

Penatalaksanaan tumor rongga mulut dan wilayah kepala-leher memerlukan pendekatan multidisipliner yang melibatkan berbagai tenaga kesehatan, termasuk dokter gigi, dokter spesialis bedah mulut, dokter spesialis THT-KL, ahli patologi anatomi, ahli onkologi, dan tenaga kesehatan lainnya. Oleh karena itu, sistem rujukan yang terorganisasi dengan baik menjadi komponen penting dalam menjamin keberlangsungan diagnosis dan terapi pasien secara optimal.

Dokter gigi sering kali menjadi tenaga kesehatan pertama yang menemukan kelainan pada rongga mulut. Kemampuan dokter gigi dalam mengenali lesi yang mencurigakan merupakan langkah awal yang menentukan keberhasilan diagnosis dini tumor kepala-leher. Lesi yang menunjukkan tanda keganasan seperti ulserasi yang tidak sembuh, pembesaran jaringan yang progresif, perdarahan spontan, atau perubahan warna mukosa perlu segera dirujuk untuk pemeriksaan lebih lanjut, termasuk pemeriksaan histopatologi dan IHK.

Proses rujukan idealnya dilakukan secara sistematis dengan menyertakan informasi klinis yang lengkap, termasuk riwayat penyakit, durasi lesi, hasil pemeriksaan klinis, dokumentasi foto intraoral, serta tindakan yang telah dilakukan sebelumnya. Informasi yang memadai membantu mempercepat proses diagnosis dan mengurangi kebutuhan pemeriksaan ulang yang tidak diperlukan. Koordinasi yang baik antara fasilitas pelayanan primer dan pusat rujukan meningkatkan efisiensi pelayanan serta mempercepat penanganan pasien.

Jaringan layanan onkologi kepala-leher umumnya terdiri atas fasilitas pelayanan kesehatan primer, rumah sakit rujukan sekunder, dan pusat layanan tersier yang memiliki fasilitas diagnostik lengkap seperti pemeriksaan histopatologi, IHK, dan pencitraan medis. Pemeriksaan IHK biasanya dilakukan di laboratorium patologi anatomi yang memiliki peralatan dan sumber daya manusia terlatih untuk menjamin kualitas hasil pemeriksaan.

Kolaborasi antarprofesi menjadi kunci keberhasilan penatalaksanaan tumor kepala-leher. Diskusi kasus melalui forum tim multidisipliner memungkinkan integrasi data klinis, radiologis, dan patologis sehingga menghasilkan keputusan terapi yang lebih tepat. Pendekatan ini membantu menentukan pilihan terapi seperti pembedahan, radioterapi, kemoterapi, atau terapi kombinasi sesuai kondisi pasien.

Selain aspek diagnostik dan terapi, jaringan layanan onkologi juga berperan dalam pemantauan jangka panjang pasien. Pemeriksaan berkala diperlukan untuk mendeteksi kekambuhan penyakit atau komplikasi terapi. Dokter gigi berperan dalam pemeliharaan kesehatan rongga mulut pasien selama dan setelah terapi kanker, termasuk pencegahan infeksi, pengelolaan mukositis, serta rehabilitasi fungsi oral.

Sistem rujukan yang efektif dan jaringan layanan onkologi yang terintegrasi memungkinkan pelayanan pasien tumor kepala-leher dilakukan secara berkesinambungan. Pendekatan ini meningkatkan ketepatan diagnosis, mempercepat terapi, serta mendukung keberhasilan penatalaksanaan pasien secara keseluruhan.

PERTANYAAN:

1. Mengapa hasil pemeriksaan IHK perlu diinterpretasikan secara multidisipliner dalam perencanaan terapi tumor rongga mulut?
2. Bagaimana peran marker proliferasi dalam membantu penentuan terapi adjuvan pada pasien tumor rongga mulut?
3. Bagaimana IHK dapat digunakan untuk memantau respons terapi pada pasien kanker rongga mulut?

RINGKASAN:

IHK merupakan metode diagnostik molekuler yang penting dalam penegakan diagnosis dan penatalaksanaan tumor rongga mulut. Teknik ini memungkinkan identifikasi biomarker spesifik yang membantu menentukan jenis tumor, tingkat keganasan, serta karakteristik biologis sel tumor. Informasi yang diperoleh dari pemeriksaan IHK berperan dalam perencanaan terapi yang lebih tepat dan individual.

Dalam praktik klinis, IHK juga digunakan untuk menentukan kebutuhan terapi adjuvan melalui analisis marker proliferasi dan marker molekuler lainnya. Selain itu, pemeriksaan IHK dapat membantu memantau respons terapi dengan mengevaluasi perubahan ekspresi biomarker setelah pengobatan.

Dokter gigi memiliki peran penting dalam proses diagnosis dan manajemen tumor rongga mulut, terutama dalam deteksi dini lesi mencurigakan, pengambilan spesimen biopsi yang adekuat, serta koordinasi dengan dokter spesialis patologi anatomi dan tim multidisipliner. Interpretasi hasil IHK yang tepat akan membantu meningkatkan ketepatan diagnosis dan keberhasilan terapi pasien.

B. Peran Dokter Gigi dalam Skrining dan Deteksi Dini

Dokter gigi memiliki peran yang sangat penting dalam skrining dan deteksi dini keganasan rongga mulut dan kepala-leher karena sebagian besar lesi awal muncul pada mukosa oral yang mudah diamati melalui pemeriksaan klinis rutin. Banyak pasien kanker rongga mulut pertama kali datang ke dokter gigi dengan keluhan yang tampak ringan seperti sariawan yang tidak sembuh, luka kronis, atau pembengkakan jaringan lunak. Oleh karena itu, dokter gigi sering menjadi tenaga kesehatan pertama yang memiliki kesempatan untuk mengenali tanda awal keganasan sebelum penyakit mencapai stadium lanjut.

Deteksi dini memiliki dampak yang signifikan terhadap prognosis pasien. Tumor yang terdiagnosis pada stadium awal umumnya memiliki angka kesintasan yang lebih tinggi serta membutuhkan terapi yang lebih konservatif dibandingkan tumor stadium lanjut. Dengan demikian, kemampuan dokter gigi dalam melakukan skrining klinis, menentukan indikasi biopsi, serta memberikan edukasi kepada pasien merupakan komponen penting dalam pengendalian kanker rongga mulut.

Selain melakukan pemeriksaan klinis, dokter gigi juga berperan dalam mengidentifikasi pasien dengan faktor risiko tinggi, melakukan pemantauan lesi prakanker, serta merujuk pasien secara tepat waktu untuk pemeriksaan histopatologi dan IHK. Pendekatan ini merupakan bagian dari strategi deteksi dini yang terintegrasi dalam sistem pelayanan onkologi kepala-leher.

1. Kriteria Klinis untuk Mengindikasikan Biopsi Lebih Lanjut

Salah satu tanggung jawab utama dokter gigi dalam deteksi dini keganasan adalah menentukan kapan suatu lesi memerlukan pemeriksaan biopsi lebih lanjut. Tidak semua lesi pada rongga mulut bersifat ganas, namun beberapa karakteristik klinis dapat menjadi indikator penting adanya perubahan displastik atau neoplastik yang memerlukan evaluasi histopatologi.

Lesi yang tidak menunjukkan perbaikan setelah terapi konservatif selama dua minggu merupakan indikasi utama untuk dilakukan biopsi. Luka traumatik atau inflamasi biasanya menunjukkan penyembuhan dalam waktu singkat setelah faktor penyebab dihilangkan. Lesi yang menetap atau semakin membesar harus dicurigai sebagai kemungkinan lesi prakanker atau keganasan. Beberapa karakteristik klinis yang perlu diwaspadai meliputi:

1. Ulkus kronis dengan tepi meninggi atau indurasi
2. Leukoplakia (bercak putih yang tidak dapat dihapus)
3. Eritroplakia (bercak merah dengan batas tidak jelas)
4. Lesi campuran merah-putih (eritroleukoplakia)
5. Nodul atau massa jaringan lunak yang progresif
6. Permukaan mukosa yang kasar atau verrukosa
7. Pembengkakan jaringan yang tidak diketahui penyebabnya
8. Perdarahan spontan tanpa trauma
9. Nyeri persisten atau sensasi terbakar
10. Mobilitas gigi tanpa penyebab periodontal jelas
11. Limfadenopati servikal yang menetap

Lokasi lesi juga memengaruhi tingkat kecurigaan klinis. Area dengan risiko tinggi keganasan meliputi lateral lidah, dasar mulut, mukosa bukal posterior, palatum lunak dan orofaring. Selain karakteristik lesi, faktor risiko pasien juga harus dipertimbangkan dalam menentukan indikasi biopsi. Pasien dengan riwayat merokok, konsumsi alkohol kronis, infeksi HPV, atau riwayat kanker sebelumnya memiliki risiko lebih tinggi mengalami keganasan rongga mulut.

Jenis biopsi yang dapat dilakukan oleh dokter gigi meliputi biopsi insisional atau eksisional tergantung ukuran dan lokasi lesi. Sampel jaringan yang diperoleh kemudian dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk pemeriksaan histopatologi dan, bila diperlukan, pemeriksaan IHC. Penentuan indikasi biopsi yang tepat memungkinkan diagnosis lebih dini dan meningkatkan peluang keberhasilan terapi.

2. Edukasi Pasien dan Komunikasi Risiko

Selain peran diagnostik, dokter gigi juga memiliki tanggung jawab penting dalam memberikan edukasi kepada pasien mengenai risiko kanker rongga mulut dan pentingnya deteksi dini. Edukasi yang efektif dapat meningkatkan kesadaran pasien terhadap gejala awal keganasan serta mendorong pasien untuk mencari pertolongan medis lebih awal.

Banyak pasien tidak menyadari bahwa perubahan kecil pada mukosa oral dapat menjadi tanda awal kanker. Oleh karena itu, dokter gigi perlu menjelaskan tanda-tanda yang perlu diwaspadai, seperti luka yang tidak sembuh, bercak merah atau putih, benjolan pada rongga mulut, atau kesulitan menelan yang menetap.

Komunikasi risiko harus dilakukan secara jelas dan mudah dipahami tanpa menimbulkan kecemasan berlebihan. Dokter gigi perlu menjelaskan bahwa biopsi merupakan prosedur diagnostik yang bertujuan memastikan diagnosis, bukan berarti pasien pasti menderita kanker. Pendekatan komunikasi yang empatik membantu meningkatkan kepatuhan pasien terhadap pemeriksaan lanjutan.

Edukasi pasien juga mencakup informasi mengenai faktor risiko yang dapat dimodifikasi, seperti kebiasaan merokok, konsumsi alkohol berlebihan, kebersihan rongga mulut yang buruk, trauma kronis dari gigi tajam atau gigi tiruan yang tidak pas, paparan sinar ultraviolet pada bibir serta infeksi HPV. Dalam hal ini dokter gigi dapat berperan dalam memberikan konseling berhenti merokok dan anjuran gaya hidup sehat sebagai bagian dari pencegahan kanker rongga mulut. Selain itu, dokter gigi perlu menjelaskan pentingnya pemeriksaan kontrol berkala, terutama pada pasien dengan lesi prakanker seperti leukoplakia atau lichen planus. Pemantauan berkala memungkinkan perubahan lesi dapat terdeteksi lebih awal sebelum berkembang menjadi keganasan invasif.

Komunikasi yang baik juga mencakup penjelasan mengenai proses rujukan ke dokter spesialis atau rumah sakit. Pasien perlu memahami alasan rujukan dan pentingnya pemeriksaan lanjutan seperti histopatologi atau IHK agar tidak terjadi keterlambatan diagnosis.

3. Skrining Populasi Risiko di Praktik Gigi

Praktik dokter gigi merupakan tempat yang strategis untuk melakukan skrining kanker rongga mulut karena sebagian besar pasien datang untuk pemeriksaan rutin atau perawatan gigi. Kesempatan ini dapat dimanfaatkan untuk melakukan pemeriksaan mukosa oral secara sistematis sebagai bagian dari pemeriksaan standar.

Skrining rongga mulut dilakukan melalui inspeksi visual dan palpasi jaringan lunak secara menyeluruh. Pemeriksaan meliputi bibir dan mukosa labial, mukosa bukal, gingiva, lidah bagian dorsal, lateral, dan ventral, dasar mulut, palatum keras dan lunak serta orofaring posterior.

Selain inspeksi visual, palpasi jaringan lunak penting untuk mendeteksi indurasi atau massa submukosa yang mungkin tidak terlihat secara langsung. Pemeriksaan kelenjar limfa servikal juga perlu dilakukan untuk mendeteksi pembesaran kelenjar yang mencurigakan.

Skrining sangat penting terutama pada kelompok populasi risiko tinggi, antara lain:

- Perokok aktif maupun mantan perokok
- Pengonsumsi alkohol kronis
- Pasien berusia di atas 40 tahun
- Pasien dengan riwayat lesi prakanker
- Pasien dengan riwayat kanker kepala-leher
- Pasien dengan infeksi HPV
- Pasien dengan immunosupresi

Pada kelompok risiko tinggi, pemeriksaan mukosa oral sebaiknya dilakukan secara lebih rutin dan sistematis. Dokumentasi klinis berupa catatan tertulis dan foto intraoral sangat membantu dalam pemantauan perubahan lesi dari waktu ke waktu. Dokter gigi juga dapat menggunakan pendekatan recall system untuk memanggil kembali pasien dengan lesi prakanker atau faktor risiko tinggi untuk pemeriksaan berkala. Pendekatan ini memungkinkan perubahan kecil dapat terdeteksi sebelum berkembang menjadi kanker invasif.

Meskipun teknik tambahan seperti pewarnaan vital atau alat deteksi fluoresensi tersedia, pemeriksaan klinis yang teliti tetap merupakan metode skrining yang paling penting dan paling mudah diterapkan di praktik gigi. Melalui skrining rutin, edukasi pasien, dan penentuan indikasi biopsi yang tepat, dokter gigi memiliki kontribusi besar dalam menurunkan keterlambatan diagnosis kanker rongga mulut. Peran ini menjadikan dokter gigi sebagai bagian integral dalam sistem deteksi dini kanker kepala-leher yang berbasis pelayanan primer.

PERTANYAAN:

1. Mengapa dokter gigi memiliki peran penting dalam skrining dan deteksi dini keganasan rongga mulut dan kepala-leher?
2. Apa saja kriteria klinis pada lesi rongga mulut yang menjadi indikasi untuk dilakukan biopsi lebih lanjut?
3. Mengapa skrining rongga mulut secara rutin penting dilakukan pada populasi dengan faktor risiko tinggi di praktik dokter gigi?

RINGKASAN:

Dokter gigi memiliki peran penting dalam skrining dan deteksi dini keganasan rongga mulut dan kepala-leher karena lesi awal umumnya dapat diamati melalui pemeriksaan klinis rutin. Deteksi dini memungkinkan diagnosis pada stadium awal sehingga meningkatkan prognosis dan memungkinkan terapi yang lebih konservatif. Dokter gigi berperan dalam melakukan pemeriksaan mukosa oral, mengidentifikasi pasien berisiko tinggi, menentukan indikasi biopsi, memberikan edukasi pasien, serta merujuk pasien untuk pemeriksaan histopatologi dan IHC.

Biopsi dianjurkan pada lesi yang tidak sembuh dalam waktu sekitar dua minggu atau menunjukkan tanda mencurigakan seperti ulkus kronis, leukoplakia, eritroplakia, massa jaringan lunak, atau limfadenopati yang menetap, terutama pada area risiko tinggi seperti lidah lateral dan dasar mulut. Faktor risiko seperti merokok, konsumsi alkohol, infeksi HPV, dan riwayat kanker juga perlu dipertimbangkan dalam penentuan biopsi.

Dokter gigi juga berperan dalam edukasi pasien mengenai tanda awal kanker rongga mulut, faktor risiko yang dapat dimodifikasi, serta pentingnya pemeriksaan berkala dan rujukan tepat waktu. Skrining di praktik gigi dilakukan melalui inspeksi dan palpasi jaringan lunak secara sistematis, terutama pada kelompok risiko tinggi. Dokumentasi klinis dan pemantauan berkala membantu mendeteksi perubahan lesi lebih awal.

Melalui skrining rutin, edukasi pasien, dan rujukan yang tepat, dokter gigi menjadi bagian penting dalam sistem deteksi dini kanker rongga mulut dan kepala-leher.

C. Keterbatasan Diagnostik IHK di Praktik Klinik Gigi

Meskipun IHK merupakan metode diagnostik yang sangat penting dalam identifikasi biomarker tumor rongga mulut, penerapannya secara langsung di praktik klinik gigi memiliki berbagai keterbatasan. Pemeriksaan IHK membutuhkan fasilitas laboratorium patologi anatomi yang lengkap serta tenaga ahli yang terlatih, sehingga sebagian besar dokter gigi hanya berperan dalam tahap deteksi awal, pengambilan biopsi, dan rujukan pasien untuk pemeriksaan lanjutan. Selain keterbatasan fasilitas, terdapat pula kendala dalam hal interpretasi hasil, standarisasi prosedur, serta integrasi hasil IHK dengan kondisi klinis pasien. Pemahaman mengenai keterbatasan ini penting agar dokter gigi dapat menggunakan informasi IHK secara tepat tanpa menimbulkan kesalahan diagnosis atau keputusan terapi yang tidak sesuai.

1. Keterbatasan Teknis dan Logistik

Pelaksanaan pemeriksaan IHK memerlukan prosedur laboratorium yang kompleks dan terstandarisasi dengan baik. Proses IHK dimulai dari fiksasi jaringan menggunakan formalin bufer netral, pembuatan blok parafin, pemotongan jaringan dengan mikrotom, hingga proses pewarnaan menggunakan antibodi spesifik. Setiap tahap harus dilakukan secara tepat karena kesalahan kecil dapat memengaruhi kualitas hasil pewarnaan dan akurasi diagnosis.

Sebagian besar praktik dokter gigi tidak memiliki fasilitas laboratorium histopatologi maupun IHK. Peralatan seperti mikrotom,

inkubator, *water bath*, sistem pewarnaan otomatis, serta mikroskop dengan resolusi tinggi umumnya hanya tersedia di laboratorium patologi anatomi rumah sakit atau pusat diagnostik khusus. Selain itu, reagen IHK seperti antibodi primer, antibodi sekunder, bufer antigen *retrieval*, serta kromogen memerlukan penyimpanan pada suhu tertentu dan memiliki masa simpan terbatas. Kondisi ini membuat pelaksanaan IHK di klinik gigi secara mandiri hampir tidak mungkin dilakukan.

Kualitas sampel jaringan juga menjadi faktor penting yang sering menjadi kendala logistik. Sampel biopsi yang diambil oleh dokter gigi harus segera difiksasi dengan benar agar struktur jaringan dan antigen tetap terjaga. Fiksasi yang terlalu lama atau terlalu singkat dapat menyebabkan degradasi antigen sehingga pewarnaan IHK menjadi tidak optimal atau menghasilkan hasil negatif palsu. Selain itu, ukuran sampel biopsi yang terlalu kecil atau kerusakan mekanis selama pengambilan jaringan dapat menyulitkan evaluasi histopatologi dan IHK.

Proses pengiriman sampel ke laboratorium patologi anatomi juga memerlukan perhatian khusus. Jaringan harus dikemas dalam wadah kedap yang berisi larutan formalin dengan volume yang cukup. Kesalahan dalam transportasi, seperti kebocoran wadah atau keterlambatan pengiriman, dapat menyebabkan penurunan kualitas jaringan. Di beberapa daerah dengan akses laboratorium terbatas, waktu pengiriman yang panjang dapat memperlambat diagnosis dan penentuan terapi.

Selain aspek teknis, keterbatasan biaya juga menjadi faktor yang perlu dipertimbangkan. Pemeriksaan IHK umumnya lebih mahal

dibandingkan pemeriksaan histopatologi rutin dengan pewarnaan Hematoxylin & Eosin (H&E). Pada beberapa pasien, keterbatasan biaya dapat menyebabkan pemeriksaan IHC tidak dilakukan secara lengkap sehingga informasi biomarker menjadi terbatas. Hal ini dapat memengaruhi ketepatan diagnosis dan pemilihan terapi.

Waktu tunggu hasil IHC juga merupakan kendala praktis dalam pelayanan klinik. Pemeriksaan IHC biasanya memerlukan waktu beberapa hari hingga satu atau dua minggu tergantung jumlah marker yang diperiksa dan kapasitas laboratorium. Penundaan hasil dapat memengaruhi perencanaan terapi, terutama pada kasus tumor yang bersifat agresif dan membutuhkan penanganan segera.

Selain itu, variasi metode antar laboratorium dapat menyebabkan perbedaan hasil pemeriksaan. Perbedaan jenis antibodi, teknik antigen *retrieval*, sistem deteksi, serta metode penilaian dapat menghasilkan variasi intensitas pewarnaan. Tanpa standarisasi yang baik, interpretasi hasil dari laboratorium yang berbeda dapat menjadi sulit dibandingkan secara langsung.

2. Masalah Interpretasi oleh Non-Patolog

Interpretasi hasil IHC merupakan proses yang kompleks dan memerlukan keahlian khusus dalam bidang patologi anatomi. Penilaian hasil IHC tidak hanya didasarkan pada ada atau tidaknya pewarnaan, tetapi juga melibatkan analisis pola distribusi, intensitas pewarnaan, lokasi ekspresi antigen, serta korelasinya dengan gambaran histopatologi dan kondisi klinis pasien.

Dokter gigi yang tidak memiliki pelatihan khusus dalam patologi jaringan sering kali menghadapi kesulitan dalam memahami makna klinis dari hasil IHK. Misalnya, pewarnaan yang lemah atau tidak merata dapat disebabkan oleh ekspresi antigen yang rendah atau oleh masalah teknis pada proses pewarnaan. Tanpa pemahaman yang cukup, hasil tersebut dapat disalahartikan sebagai hasil negatif atau positif yang tidak bermakna.

Interpretasi juga menjadi lebih kompleks karena beberapa marker IHK memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang berbeda. Satu marker saja sering kali tidak cukup untuk menegaskan diagnosis sehingga diperlukan panel marker yang harus diinterpretasikan secara bersama-sama. Tanpa pemahaman mengenai hubungan antar marker, dokter gigi dapat mengalami kesulitan dalam menarik kesimpulan diagnostik yang tepat.

Masalah lain adalah penggunaan sistem skor kuantitatif dalam beberapa pemeriksaan IHK. Penilaian seperti TPS, CPS, atau indeks proliferasi Ki-67 memerlukan perhitungan persentase sel positif serta penilaian intensitas pewarnaan. Penilaian ini membutuhkan pengalaman dan konsistensi yang tinggi agar hasil dapat diandalkan. Variasi antar pemeriksa dapat menyebabkan perbedaan interpretasi yang signifikan.

Selain itu, heterogenitas tumor juga dapat memengaruhi interpretasi hasil IHK. Ekspresi biomarker dapat bervariasi pada bagian tumor yang berbeda, sehingga hasil IHK dari satu area biopsi belum tentu mewakili seluruh tumor. Dokter gigi yang tidak memahami konsep ini dapat menganggap hasil IHK sebagai gambaran absolut dari seluruh tumor.

Kesalahan interpretasi juga dapat terjadi apabila hasil IHK tidak dikorelasikan dengan data klinis dan radiologis. Sebagai contoh, ekspresi marker epitel seperti sitokeratin dapat membantu mengidentifikasi asal tumor, tetapi interpretasi yang benar tetap memerlukan informasi mengenai lokasi lesi dan riwayat penyakit pasien. Tanpa korelasi klinis yang memadai, hasil IHK dapat disalahartikan dan menyebabkan kesalahan diagnosis.

Oleh karena itu, interpretasi hasil IHK sebaiknya dilakukan oleh ahli patologi anatomi sebagai pihak yang memiliki kompetensi dalam evaluasi jaringan. Dokter gigi berperan dalam memahami implikasi klinis dari hasil yang telah diinterpretasikan, bukan dalam menafsirkan pewarnaan secara langsung. Kolaborasi antara dokter gigi, ahli patologi anatomi, dan tim onkologi sangat penting untuk memastikan bahwa informasi dari pemeriksaan IHK digunakan secara tepat dalam manajemen pasien.

Dengan memahami keterbatasan teknis dan interpretatif ini, dokter gigi dapat menggunakan pemeriksaan IHK secara lebih rasional sebagai bagian dari sistem diagnostik terpadu, sekaligus menghindari kesalahan dalam pengambilan keputusan klinis.

3. Keterbatasan Penggunaan IHK dalam Evaluasi Lesi Prakanker di Klinik Gigi

Dalam praktik klinik gigi, lesi prakanker rongga mulut seperti leukoplakia, eritroplakia, dan displasia epitel merupakan kondisi yang sering menimbulkan dilema klinis. Tantangan utama bukan hanya

menegakkan diagnosis histopatologis, tetapi juga memperkirakan kemungkinan transformasi ganas menjadi karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Seiring berkembangnya pemahaman mengenai biomarker molekuler, muncul harapan bahwa pemeriksaan IHK dapat membantu memprediksi risiko transformasi secara lebih akurat dan lebih dini dibandingkan evaluasi morfologi semata.

Namun demikian, dalam konteks praktik klinik gigi, penggunaan IHK pada lesi prakanker memiliki keterbatasan yang signifikan. Keterbatasan ini tidak hanya bersifat teknis, tetapi juga biologis dan konseptual. Pemahaman yang komprehensif terhadap batasan tersebut sangat penting agar hasil IHK tidak disalahartikan sebagai penentu absolut risiko keganasan.

Secara biologis, transformasi ganas pada epitel rongga mulut merupakan proses yang kompleks dan multifaktorial. Perubahan dari epitel normal menjadi displasia, dan selanjutnya menjadi karsinoma invasif, melibatkan akumulasi gangguan genetik dan epigenetik yang terjadi secara bertahap. Proses ini mencakup peningkatan proliferasi sel, gangguan mekanisme apoptosis, instabilitas genomik, perubahan adhesi sel, hingga interaksi dengan mikro lingkungan dan sistem imun. Oleh karena itu, tidak ada satu pun protein atau jalur molekuler tunggal yang sepenuhnya merepresentasikan keseluruhan proses transformasi tersebut.

Dalam praktiknya, beberapa biomarker seperti Ki-67, p53, serta marker terkait *epithelial-mesenchymal transition* (EMT) sering digunakan untuk menilai aktivitas biologis lesi prakanker. Peningkatan

ekspresi Ki-67, misalnya, diinterpretasikan sebagai peningkatan aktivitas proliferasi sel. Akumulasi p53 dianggap berkaitan dengan gangguan regulasi siklus sel. Sementara itu, perubahan ekspresi E-cadherin atau peningkatan marker mesenkimal dipandang sebagai indikasi pergeseran menuju fenotip yang lebih agresif.

Meskipun demikian, ekspresi biomarker tersebut tidak selalu memiliki korelasi langsung dengan kejadian transformasi ganas pada tingkat individual. Dalam berbagai penelitian populasi, memang ditemukan asosiasi antara peningkatan ekspresi biomarker tertentu dengan risiko transformasi yang lebih tinggi. Akan tetapi, asosiasi statistik pada tingkat kelompok tidak dapat secara otomatis diterjemahkan menjadi prediksi pasti pada satu pasien tertentu. Dengan kata lain, lesi dengan ekspresi biomarker tinggi belum tentu akan berkembang menjadi karsinoma invasif, dan sebaliknya, lesi dengan ekspresi rendah tidak sepenuhnya bebas risiko.

Selain faktor biologis, keterbatasan lain yang perlu dipertimbangkan adalah variabilitas derajat displasia dan hubungannya dengan biomarker. Secara histopatologis, displasia epitel diklasifikasikan berdasarkan perubahan arsitektur dan sitologi. Namun, tingkat ekspresi biomarker tidak selalu sejalan secara linear dengan derajat displasia tersebut. Pada beberapa kasus, displasia ringan dapat menunjukkan aktivitas proliferaatif yang relatif tinggi, sedangkan sebagian displasia berat mungkin tidak menunjukkan ekspresi marker yang mencolok. Variasi ini mencerminkan heterogenitas molekuler antar lesi dan antar individu.

Di sisi lain, aspek representativitas sampel juga menjadi faktor pembatas yang signifikan. Biopsi insisional yang dilakukan di klinik gigi hanya mengambil sebagian kecil dari keseluruhan lesi. Padahal, perubahan molekuler pada lesi prakanker sering kali bersifat fokal dan tidak merata. Area dengan aktivitas molekuler tinggi mungkin tidak terambil dalam spesimen biopsi, sehingga hasil IHK memberikan gambaran yang kurang mencerminkan kondisi sebenarnya. Sebaliknya, biopsi yang diambil dari area inflamasi aktif dapat menunjukkan peningkatan marker proliferasi akibat regenerasi epitel reaktif, bukan akibat progresi neoplastik. Kondisi ini berpotensi menimbulkan interpretasi yang berlebihan terhadap risiko keganasan.

Lebih lanjut, perlu dipahami bahwa ekspresi protein yang terdeteksi melalui IHK tidak selalu identik dengan aktivitas fungsionalnya. Deteksi p53 melalui IHK, misalnya, menunjukkan akumulasi protein di dalam inti sel, tetapi tidak dapat memastikan apakah protein tersebut mengalami mutasi patogenik atau hanya mengalami stabilisasi sementara. Demikian pula, perubahan ekspresi marker EMT pada lesi prakanker belum tentu menunjukkan bahwa sel telah memperoleh kapasitas invasif penuh. Interpretasi yang terlalu jauh dari temuan IHK dapat menyebabkan kesimpulan yang tidak proporsional terhadap kondisi biologis sebenarnya.

Dalam konteks praktik klinik gigi, keterbatasan ini memiliki implikasi langsung terhadap pengambilan keputusan. Hasil IHK pada lesi prakanker seharusnya tidak digunakan sebagai dasar tunggal untuk menentukan tindakan agresif seperti eksisi luas tanpa

mempertimbangkan faktor lain. Evaluasi klinis serial, pemantauan berkala, dan korelasi dengan temuan histopatologi tetap merupakan pendekatan utama dalam manajemen lesi prakanker.

Adapun beberapa aspek keterbatasan penggunaan IHC pada lesi prakanker di klinik gigi dapat dirangkum sebagai berikut:

1. Ketidakmampuan biomarker tunggal untuk merepresentasikan keseluruhan proses transformasi ganas yang kompleks dan multifaktorial.
2. Variabilitas hubungan antara derajat displasia histopatologis dan tingkat ekspresi biomarker.
3. Keterbatasan representativitas sampel biopsi insisional terhadap keseluruhan lesi.
4. Pengaruh inflamasi dan regenerasi epitel yang dapat meningkatkan ekspresi marker secara reaktif.
5. Nilai prediktif individual yang terbatas meskipun terdapat asosiasi statistik pada tingkat populasi.
6. Ketidakpastian apakah ekspresi protein yang terdeteksi benar-benar mencerminkan aktivitas biologis fungsional.

Dengan memahami berbagai keterbatasan tersebut, dokter gigi dapat menempatkan hasil IHC secara proporsional dalam kerangka diagnostik yang lebih luas. IHC tetap memiliki nilai sebagai alat bantu untuk memahami dinamika molekuler lesi prakanker, tetapi penggunaannya harus disertai kesadaran bahwa prediksi transformasi ganas tidak dapat disederhanakan menjadi hasil positif atau negatif suatu biomarker.

Pada akhirnya, manajemen lesi prakanker di klinik gigi tetap bertumpu pada deteksi dini, biopsi yang adekuat, evaluasi histopatologis yang cermat, serta pemantauan jangka panjang yang konsisten. IHK berperan sebagai pelengkap dalam proses tersebut, bukan sebagai penentu tunggal arah perjalanan penyakit.

PERTANYAAN:

1. Apa saja keterbatasan teknis dan interpretasi dalam penggunaan IHK pada diagnosis penyakit rongga mulut dan jaringan kepala-leher di praktik klinik gigi?
2. Bagaimana faktor biaya, ketersediaan fasilitas laboratorium, dan tenaga ahli memengaruhi pemanfaatan pemeriksaan IHK dalam praktik kedokteran gigi klinis?
3. Mengapa pemeriksaan IHK tidak dapat digunakan sebagai satu-satunya metode diagnosis dan harus dikombinasikan dengan pemeriksaan histopatologi konvensional serta data klinis pasien?

RINGKASAN:

IHK merupakan metode penting untuk identifikasi *biomarker* tumor rongga mulut, namun penerapannya di praktik klinik gigi memiliki berbagai keterbatasan. Dokter gigi umumnya hanya berperan dalam deteksi awal, pengambilan biopsi, dan rujukan pasien karena pemeriksaan IHK memerlukan fasilitas laboratorium khusus dan tenaga ahli patologi anatomi.

Keterbatasan teknis dan logistik meliputi kebutuhan peralatan laboratorium khusus, reagen yang mahal dan sensitif, serta prosedur yang kompleks dan terstandarisasi. Kualitas sampel biopsi, proses fiksasi, dan pengiriman jaringan sangat memengaruhi hasil pemeriksaan. Selain itu, biaya pemeriksaan yang relatif tinggi, waktu tunggu hasil yang cukup lama, serta variasi metode antar laboratorium dapat menjadi kendala dalam pelayanan klinis.

Interpretasi hasil IHK juga menjadi tantangan karena memerlukan keahlian khusus dalam menilai pola dan intensitas pewarnaan serta korelasinya dengan gambaran histopatologi dan kondisi klinis pasien. Dokter gigi yang bukan ahli patologi dapat mengalami kesulitan dalam memahami makna diagnostik hasil IHK, terutama karena diperlukan interpretasi panel marker, penggunaan sistem skor kuantitatif, serta pemahaman heterogenitas tumor.

Oleh karena itu, hasil IHK sebaiknya diinterpretasikan oleh ahli patologi anatomi dan digunakan secara kolaboratif dalam tim multidisipliner. Pemahaman dokter gigi terhadap keterbatasan IHK membantu memastikan penggunaan pemeriksaan ini secara tepat

D. Perspektif Masa Depan Penggunaan IHC dan *Biomarker* dalam Praktik Klinik Gigi

Perkembangan ilmu biologi molekuler dan onkologi dalam dua dekade terakhir telah mengubah cara pandang terhadap proses karsinogenesis rongga mulut, termasuk perjalanan lesi prakanker menuju karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Jika pada masa lalu penilaian risiko terutama bertumpu pada evaluasi klinis dan gambaran histopatologi konvensional, maka kini semakin disadari bahwa perubahan molekuler mendahului perubahan morfologis yang tampak di bawah mikroskop. Dalam konteks tersebut, IHC dan *biomarker* molekuler memiliki potensi besar untuk memperkaya sistem deteksi dini di praktik klinik gigi. Namun, pemanfaatannya di masa depan memerlukan pendekatan yang lebih terintegrasi, terstandarisasi, dan berbasis bukti ilmiah yang kuat.

Salah satu arah perkembangan yang paling menjanjikan adalah penggunaan pendekatan multiparametrik dalam evaluasi risiko lesi prakanker. Alih-alih mengandalkan satu biomarker tunggal, model masa depan kemungkinan akan menggabungkan beberapa parameter biologis secara simultan, seperti indeks proliferasi, ekspresi protein regulator siklus sel, *marker* EMT, serta indikator respons imun lokal. Kombinasi tersebut berpotensi menghasilkan profil biologis lesi yang lebih komprehensif dibandingkan interpretasi satu marker secara terpisah. Bagi praktik klinik gigi, pendekatan ini dapat membantu dalam stratifikasi pasien menjadi kelompok risiko rendah, sedang, atau tinggi, sehingga interval kontrol dan strategi manajemen dapat disesuaikan secara lebih rasional.

Selain integrasi *biomarker*, kemajuan teknologi *digital pathology* dan kecerdasan buatan juga diperkirakan akan memengaruhi praktik diagnostik di masa depan. Digitalisasi preparat histopatologi dan IHC memungkinkan analisis kuantitatif yang lebih objektif terhadap intensitas dan distribusi pewarnaan. Algoritma berbasis machine learning berpotensi membantu mengurangi variasi antar pengamat, menghitung indeks proliferasi secara konsisten, serta mengidentifikasi pola ekspresi yang sulit dikenali secara visual. Dalam praktik klinik gigi, khususnya di daerah dengan keterbatasan akses terhadap ahli patologi, teknologi telepatologi dapat memperluas akses terhadap konsultasi spesialis dan meningkatkan kualitas interpretasi laporan.

Di sisi lain, penelitian masa depan kemungkinan akan lebih menekankan pada studi longitudinal jangka panjang terhadap pasien dengan lesi prakanker. Melalui pemantauan berkala yang dikombinasikan dengan analisis biomarker, diharapkan dapat dikembangkan model prediksi transformasi ganas yang memiliki nilai prediktif individual lebih tinggi. Model ini tidak hanya mempertimbangkan ekspresi protein tertentu, tetapi juga faktor klinis seperti lokasi lesi, ukuran, kebiasaan merokok, dan kondisi sistemik pasien. Pendekatan semacam ini akan memperkuat konsep manajemen berbasis risiko (*risk-based management*) dalam praktik klinik gigi.

Perkembangan *biomarker* juga membuka peluang menuju pendekatan kedokteran gigi yang lebih personal atau *personalized dentistry*. Di masa mendatang, keputusan mengenai eksisi, observasi, atau frekuensi kontrol mungkin tidak lagi didasarkan semata pada derajat

displasia histologis, tetapi juga pada profil biologis spesifik masing-masing pasien. Dengan demikian, pasien dengan risiko biologis rendah dapat dihindarkan dari tindakan invasif yang tidak perlu, sementara pasien dengan risiko tinggi dapat memperoleh intervensi lebih dini dan lebih intensif. Meskipun konsep ini masih memerlukan validasi ilmiah lebih lanjut, arah penelitian global menunjukkan kecenderungan menuju individualisasi manajemen lesi prakanker.

Namun demikian, optimisme terhadap perkembangan teknologi harus diimbangi dengan sikap ilmiah yang kritis dan berhati-hati. Tidak semua biomarker baru yang menjanjikan secara eksperimental dapat langsung diterapkan dalam praktik klinis. Validasi klinis, standarisasi metode, serta pertimbangan aspek biaya dan aksesibilitas tetap menjadi faktor penentu keberhasilan implementasi. Dalam praktik klinik gigi, prinsip dasar seperti deteksi dini melalui pemeriksaan rutin, biopsi yang adekuat, dan kolaborasi dengan ahli patologi anatomi tetap merupakan fondasi utama yang tidak dapat digantikan oleh teknologi apa pun.

Pada akhirnya, perspektif masa depan penggunaan IHK dan biomarker dalam praktik klinik gigi terletak pada integrasi yang seimbang antara inovasi dan kehati-hatian. IHK tidak lagi dipandang sekadar sebagai alat konfirmasi tambahan, melainkan sebagai bagian dari sistem diagnostik yang lebih luas dan berbasis bukti. Dengan peningkatan kompetensi profesional, penguatan kolaborasi multidisiplin, serta pemanfaatan teknologi secara bertanggung jawab, dokter gigi dapat berperan aktif dalam era kedokteran presisi, tanpa mengabaikan prinsip-prinsip dasar praktik klinis yang berorientasi pada keselamatan dan kepentingan terbaik pasien.

RINGKASAN:

Perkembangan ilmu biologi molekuler dan teknologi diagnostik membuka peluang baru dalam pemanfaatan IHK dan *biomarker* untuk manajemen lesi prakanker serta karsinoma sel skuamosa rongga mulut di praktik klinik gigi. Di masa depan, penggunaan *biomarker* diperkirakan tidak lagi bertumpu pada satu indikator tunggal, melainkan pada pendekatan multiparametrik yang mengintegrasikan berbagai aspek biologis seperti proliferasi sel, regulasi siklus sel, perubahan fenotip epitel–mesenkimal, serta respons imun lokal. Pendekatan ini diharapkan mampu menghasilkan stratifikasi risiko yang lebih akurat dan mendukung pengambilan keputusan klinis berbasis risiko.

Kemajuan digital pathology dan kecerdasan buatan juga berpotensi meningkatkan objektivitas analisis IHK, mengurangi variasi antar pengamat, serta memperluas akses konsultasi melalui telepatologi. Selain itu, penelitian longitudinal jangka panjang diharapkan dapat menghasilkan model prediksi transformasi ganas yang lebih valid pada tingkat individual, sehingga mendukung konsep personalized dentistry dalam praktik klinik gigi.

Meskipun demikian, penerapan *biomarker* di masa depan tetap memerlukan validasi ilmiah, standarisasi metode, serta integrasi dengan evaluasi klinis dan histopatologis. Prinsip deteksi dini, biopsi yang adekuat, dan kolaborasi multidisiplin tetap menjadi fondasi utama dalam manajemen lesi prakanker dan OSCC. Dengan pendekatan yang seimbang antara inovasi dan kehati-hatian, IHK dan *biomarker* dapat berkembang menjadi bagian integral dari sistem diagnostik terpadu dalam praktik klinik gigi modern.

Daftar Singkatan

AJ	<i>Adherens Junction</i>
β -catenin	Beta-catenin
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CK	<i>Cytokeratin</i>
Claudin	<i>Protein tight junction</i>
CRP	<i>C-Reactive Protein</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
Δ Np63	Isoform delta N dari p63
E-cadherin	<i>Epithelial Cadherin</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	<i>Epithelial Membrane Antigen</i>
EMT	Epithelial–Mesenchymal Transition
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
IHK	Imunohistokimia
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin 6
Involucrin	Protein diferensiasi korneal
Ki-67	<i>Marker proliferasi</i>
Loricrin	<i>Protein envelope korneosit</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>

MMP	Matriks Metalloproteinase
MUC1	Mucin 1
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-B</i>
OCT4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
Occludin	Protein <i>tight junction</i>
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
p53	Tumor Protein p53
p63	Tumor Protein p63
SOX2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TAp63	Isoform transaktivasi dari p63
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TJ	<i>Tight Junction</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Wnt	<i>Wingless/Integrated Signaling Pathway</i>
ZO-1	Zonula Occludens-1

Glosarium

A

Adherens Junction (AJ)

Kompleks adhesi antar sel epitel yang dimediasi oleh protein seperti E-cadherin dan β -catenin, berperan dalam menjaga kohesi jaringan.

Afinitas Antibodi

Kekuatan ikatan antara antibodi dengan antigen spesifik yang memengaruhi sensitivitas dan spesifisitas reaksi imun.

Antibodi Primer

Antibodi yang berikatan langsung dengan antigen target dalam jaringan pada pemeriksaan imunohistokimia.

Antibodi Sekunder

Antibodi yang berikatan dengan antibodi primer dan berfungsi sebagai sistem deteksi melalui enzim atau label tertentu.

Antigen

Molekul target yang dikenali oleh antibodi dalam pemeriksaan imunohistokimia.

Antigen Retrieval

Proses pemulihan epitop antigen pada jaringan yang telah difiksasi formalin agar dapat dikenali kembali oleh antibodi.

Apoptosis

Kematian sel terprogram yang diatur secara genetik dan berperan dalam homeostasis jaringan.

Artefak

Perubahan struktur atau pewarnaan jaringan akibat proses teknis yang dapat mengganggu interpretasi.

B

Background Staining

Pewarnaan non-spesifik yang muncul di luar target antigen dan dapat mengganggu interpretasi hasil.

Bcl-2

Protein anti-apoptosis yang berperan dalam mempertahankan kelangsungan hidup sel.

β -catenin

Protein yang berperan dalam adhesi sel melalui adherens junction dan juga dalam jalur sinyal proliferasi.

C

Caspase

Enzim protease yang berperan dalam proses eksekusi apoptosis.

CD3, CD4, CD8

Marker imunohistokimia untuk identifikasi subpopulasi limfosit T.

CD20

Marker untuk sel limfosit B.

CD31

Marker sel endotel yang digunakan untuk menilai angiogenesis dan *microvascular density*.

CD44

Molekul adhesi sel yang sering dikaitkan dengan sifat stemness pada sel kanker.

Claudin

Protein utama penyusun tight junction yang berperan dalam regulasi permeabilitas antar sel.

CPS (*Combined Positive Score*)

Metode penilaian ekspresi PD-L1 yang mencakup sel tumor dan sel imun.

Cytokeratin (CK)

Protein filamen intermediat pada sel epitel yang digunakan sebagai marker diferensiasi epitel.

D***Dewaxing***

Proses penghilangan parafin dari preparat jaringan sebelum dilakukan pewarnaan.

Displasia Epitel

Perubahan pra-kanker pada epitel yang ditandai dengan atypia sel dan gangguan arsitektur jaringan.

E**E-cadherin**

Protein adhesi antar sel epitel yang penting dalam menjaga integritas jaringan.

EMA (Epithelial Membrane Antigen)

Marker epitel berupa glikoprotein membran yang digunakan dalam identifikasi sel epitel.

EMT (Epithelial–Mesenchymal Transition)

Proses perubahan sel epitel menjadi fenotip mesenkimal yang lebih motil dan invasif.

F**Fiksasi Formalin**

Proses pengawetan jaringan menggunakan formalin untuk mempertahankan struktur dan antigen.

H

Hematoxylin dan Eosin (H&E)

Metode pewarnaan dasar untuk evaluasi morfologi jaringan.

Heterogenitas Tumor

Variasi karakteristik sel dalam satu tumor yang dapat memengaruhi interpretasi biomarker.

I

Imunohistokimia (IHK)

Teknik pewarnaan jaringan menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik.

Invasivitas

Kemampuan sel tumor untuk menembus jaringan sekitarnya.

K

Ki-67

Marker proliferasi sel yang menunjukkan aktivitas pembelahan sel.

Kromogen

Substrat yang menghasilkan warna sebagai hasil reaksi enzim dalam IHK.

L

Limfosit

Sel sistem imun yang berperan dalam respons imun adaptif.

M

Makrofag

Sel imun yang berperan dalam fagositosis dan modulasi *microenvironment* tumor.

Metastasis

Penyebaran sel kanker dari lokasi primer ke organ lain.

Microenvironment Tumor

Lingkungan biologis di sekitar tumor yang terdiri dari sel imun, stroma, dan faktor sinyal.

MMP (Matrix Metalloproteinase)

Enzim yang berperan dalam degradasi matriks ekstraseluler dan invasi tumor.

N

N-cadherin

Protein adhesi yang meningkat pada proses EMT dan berkaitan dengan sifat invasif.

O

Occludin

Protein tight junction yang berperan dalam menjaga barrier antar sel epitel.

P

p53

Protein tumor suppressor yang mengatur siklus sel dan apoptosis.

p63 / p40

Marker epitel basal yang berhubungan dengan diferensiasi dan stemness.

PD-1

Reseptor checkpoint imun pada sel T yang berperan dalam penghambatan respons imun.

PD-L1

Ligand dari PD-1 yang diekspresikan oleh sel tumor untuk menghindari sistem imun.

Proliferasi Sel

Proses pembelahan dan peningkatan jumlah sel.

R

Rehidrasi

Tahap pengembalian jaringan ke kondisi berair sebelum pewarnaan.

Reproduksibilitas

Kemampuan suatu metode menghasilkan hasil yang konsisten.

S

Sensitivitas

Kemampuan metode mendeteksi antigen dalam jumlah kecil.

Spesifisitas

Kemampuan antibodi mengenali antigen target secara tepat.

SOP (*Standard Operating Procedures*)

Pedoman standar untuk menjamin konsistensi prosedur laboratorium.

T

Tight Junction

Kompleks protein yang mengatur permeabilitas antar sel epitel.

TPS (*Tumor Proportion Score*)

Persentase sel tumor yang menunjukkan ekspresi PD-L1.

V

VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

Faktor pertumbuhan yang berperan dalam angiogenesis tumor.

Vimentin

Protein sitoskeleton yang menjadi *marker* sel mesenkimal.

Indeks

Symbols

β -catenin 72, 77, 78, 79, 86, 109, 110, 202, 205, 206, 211

A

Adherens Junction 202, 205, 211

Antigen 1, 2, 3, 4, 6, 11, 20, 26, 42, 43, 76, 86, 141, 202, 205, 207, 211, 212

Antigen retrieval 26, 42, 211

Apoptosis 87, 91, 92, 205, 211

Artefak 36, 56, 205, 211

B

Background staining 211

Bcl-2 82, 88, 91, 92, 93, 94, 95, 99, 100, 202, 206, 211

C

CD3 126, 127, 128, 159, 160, 206, 211

CD4 49, 126, 127, 128, 146, 159, 160, 206, 211

CD8 45, 49, 126, 127, 128, 137, 156, 157, 158, 159, 160, 206, 211

CD20 126, 127, 128, 159, 160, 206, 211

CD31 102, 103, 123, 206, 211

CD44 71, 73, 85, 113, 115, 125, 202, 206, 211

CPS (Combined Positive Score) 207, 211

Caspase 91, 93, 206, 211

Claudin 202, 206, 211

Cytokeratin (CK) 207, 211

D

Dewaxing 22, 24, 42, 207, 211

Displasia epitel 211

E

E-cadherin 39, 46, 77, 78, 79, 81, 86, 108, 109, 110, 114, 118, 119, 121, 124, 137, 191, 202, 205, 207, 212

Epithelial-Membrane Antigen (EMA) 76, 86, 202, 207, 212

Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) 118, 202, 207, 212

F

Fiksasi formalin 212

H

Hematoxylin dan Eosin 208, 212

Heterogenitas tumor 212

I

Invasivitas 102, 208, 212

K

Ki-67 37, 39, 45, 49, 80, 87, 88, 89, 91, 97, 99, 100, 101, 137, 164, 167, 170, 188, 190, 191, 202, 208, 212, 217

Kromogen 15, 34, 208, 212

L

Limfosit 208, 212

M

Makrofag 128, 208, 212

Matrix Metalloproteinase (MMP) 209, 212

Metastasis 102, 108, 110, 111, 112, 209, 212

Microenvironment tumor 126, 160, 212

N

N-cadherin 81, 108, 109, 110, 114, 119, 124, 209, 212

O

Occludin 203, 209, 213

P

PD-1 129, 140, 141, 145, 146, 147, 148, 149, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 160, 168, 203, 209, 213

PD-L1 49, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 140, 152, 153, 157, 158, 159, 160, 161, 168, 170, 203, 207, 209, 210, 213, 215

p40 70, 71, 72, 73, 84, 85, 209, 213

p53 39, 45, 70, 80, 89, 90, 91, 96, 97, 98, 99, 100, 167, 170, 190, 191, 192, 203, 209, 213, 216

p63 70, 71, 72, 73, 77, 84, 85, 202, 203, 209, 213

R

Rehidrasi 24, 210, 213

Reproduksibilitas 55, 58, 64, 210, 213

S

Sensitivitas 210, 213

Spesifisitas 11, 210, 213

T

Tumor Proportion Score 130, 131, 132, 134, 159, 160, 168, 188, 210, 213

Tight junction 78, 213

V

VEGF 81, 102, 103, 104, 122, 123, 137, 139, 203, 210, 213, 217

Vimentin 108, 210, 213

Daftar Pustaka

- D'Amico, F., Skarmoutsou, E., & Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>
- Engel, K. B., & Moore, H. M. (2011). Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(5), 537–543. <https://doi.org/10.5858/2010-0702-RAIR.1>
- Fitzgibbons, P. L., Bradley, L. A., Fatheree, L. A., Alsabeh, R., Fulton, R. S., Goldsmith, J. D., et al. (2014). Principles of analytic validation of immunohistochemical assays: Guideline from the College of American Pathologists Pathology and Laboratory Quality Center. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(11), 1432–1443. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0610-CP>
- Girolami, I., Pantanowitz, L., Barberis, M., Paolino, G., Brunelli, M., Vigliar, E., et al. (2021). Challenges facing pathologists evaluating PD-L1 in head & neck squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 50(9), 864–873. <https://doi.org/10.1111/jop.13220>
- Hewitt, S. M., Baskin, D. G., Frevert, C. W., Stahl, W. L., & Rosa-Molinar, E. (2014). Controls for immunohistochemistry: The Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(10), 693–697. <https://doi.org/10.1369/0022155414545224>
- Howat, W. J., Lewis, A., Jones, P., Kampf, C., Pontén, F., van der Loos, C. M., et al. (2014). Antibody validation of immunohistochemistry for biomarker discovery: Recommendations of a consortium of academic and pharmaceutical based histopathology researchers. *Methods*, 70(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.018>
- Karpathiou, G., Casteillo, F., Giroult, J. B., Forest, F., Fournel, P., Monaya, A., et al. (2017). Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and

pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immunosuppressive pathways and clinicopathologic characteristics. *Oncotarget*, 8(12), 19310–19322. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14242>

Leong, A. S. Y. (2004). Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Advances in Anatomic Pathology*, 11(2), 86–93. <https://doi.org/10.1097/00125480-200403000-00002>

Li, C., Shintani, S., Terakado, N., Klosek, S. K., Ishikawa, T., Nakashiro, K., et al. (2005). Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 34(5), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2004.10.016>

Miguel, A. F. P., Mello, F. W. M., Melo, G., & Rivero, E. R. C. (2020). Association between immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases and metastasis in oral squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*, 42(3), 569–584. <https://doi.org/10.1002/hed.26009>

Mohanapure, N. S., Khandeparkar, S. G. S., Saragade, P. B., Gogate, B. P., Joshi, A. R., & Mehta, S. R. (2022). Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor, human epidermal growth factor receptor 2/neu, p53, and Ki67 in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 26(1), 127–128. https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_310_21

Rahaju, P., Kintono, R. A., Wahyudiono, A. D., Satria, A., & Sandra, F. (2020). Immunohistochemical expression of EGFR, NF- κ B and Cyclin D1 in sinonasal inverted papilloma and squamous cell carcinoma. *Indonesian Biomedical Journal*, 12(3), 239–244. <https://doi.org/10.18585/inabj.v12i3.1172>

Rahaju, P., Wirattami, A. T., Sandra, F., Kurniawan, S., Nisa, K., Soehartono, et al. (2021). A pilot study on immunohistochemical expressions

- of NF- κ B, Cyclin-D1, VEGF, and Cox-2 in advanced stage laryngeal carcinoma. *Indonesian Biomedical Journal*, 13(4), 350–354. <https://doi.org/10.18585/inabj.v13i4.1580>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426.
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When tissue antigens and antibodies get along: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87.
- Sandra, F., Hendarmin, L., & Nakamura, S. (2006). Osteoprotegerin (OPG) binds with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): Suppression of TRAIL-induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncology*, 42(4), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.09.009>
- Sandra, F., Mitsuyasu, T., Nakamura, N., Shiratsuchi, Y., & Ohishi, M. (2001). Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncology*, 37(2), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(00\)00079-8](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(00)00079-8)
- Sandra, F., Nakamura, N., Kanematsu, T., Hirata, M., & Ohishi, M. (2002). The role of MDM2 in the proliferative activity of ameloblastoma. *Oral Oncology*, 38(2), 153–157. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(01\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(01)00036-7)
- Sandra, F., Nakamura, N., Mitsuyasu, T., Shiratsuchi, Y., & Ohishi, M. (2001). Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: An anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre). *Histopathology*, 39(1), 93–98. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01138.x>
- Satir, S., & Tavmasat Mercantas, E. (2026). The role of KI67 as a marker in the diagnose and grading evaluation of oral potentially malignant disorder and oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-026-01344-0>
- Shi, S. R., Liu, C., & Taylor, C. R. (2007). Standardization of immunohistochemistry

for formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen-retrieval technique: From experiments to hypothesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(2), 105–109. <https://doi.org/10.1369/jhc.6P7080.2006>

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial–mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–890.

Zlobec, I., Steele, R., Michel, R. P., Compton, C. C., Lugli, A., & Jass, J. R. (2006). Scoring of p53, VEGF, Bcl-2 and APAF-1 immunohistochemistry and interobserver reliability in colorectal cancer. *Modern Pathology*, 19, 1236–1242. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800642>

Profil Penulis



drg. Ferry Sandra, Ph.D., MIPM, PBO, FIMMA meraih gelar dokter gigi dari Universitas Indonesia pada tahun 1996 dan gelar Doctor of Philosophy (Ph.D.) dari Kyushu University pada tahun 2001. Setelah itu, Ferry melanjutkan program postdoctoral di Harvard Medical School. Selain itu, Ferry juga memperoleh sertifikasi dalam bidang

Master of International Project Management (MIPM). Minat riset Ferry mencakup berbagai bidang, seperti Biokimia, Biologi Molekuler, Patologi, Stem Cell dan Biologi Kanker serta Pensinyalan Sel.

Saat ini, Ferry bertugas sebagai pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Selain itu, Ferry juga aktif sebagai Wakil Presiden Asian Cellular Therapy Organization (ACTO) dan Wakil Ketua Indonesian Association for the Study of Medicinals (IASMED).

Dalam rangka memajukan ilmu biomedis di Indonesia, Ferry telah mendirikan 9 pusat penelitian yang menjembatani lingkungan akademik dan industri. Ferry juga telah menjadi keynote speaker di lebih dari 300 seminar, memublikasikan lebih dari 231 artikel ilmiah dan buku, serta membimbing 50 mahasiswa pascasarjana. Publikasinya telah memperoleh lebih dari 3860 sitasi dengan H-indeks sebesar 30 pada berbagai jurnal yang diakui secara internasional dan terindeks Web of Science/ Scopus.



drg. Pretty Trisfilha, M.Biomed adalah seorang dokter gigi yang lulus dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti pada tahun 2012. Beliau melanjutkan pendidikan magister di bidang Biomedik di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan berhasil meraih gelar M.Biomed. pada tahun 2020. Pada tahun 2021, penulis mendapatkan gelar spesialis di bidang Patologi Mulut dan Maksilofasial melalui Kolegium Patologi Mulut Maksilofasial dan Ikatan Spesialis Patologi Mulut Maksilofasial Indonesia.

Sejak tahun 2014, penulis telah mengabdikan diri sebagai dosen di Departemen Patologi Oral dan Maksilofasial Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Dalam peran ini, beliau tidak hanya mengajar tetapi juga aktif dalam berbagai tugas institusional. Penulis merupakan anggota tim Hak Kekayaan Intelektual (HKI), sekretaris Pusat Studi Bahan Alam, dan sekretaris Komisi Disiplin di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Penulis juga memiliki kontribusi yang signifikan dalam bidang penelitian. Beliau telah mempublikasikan berbagai artikel ilmiah di jurnal nasional maupun internasional dengan topik-topik yang meliputi kanker mulut, obat herbal, dan patologi molekuler. Minat beliau terhadap penelitian di bidang ini menunjukkan dedikasinya dalam mengembangkan ilmu pengetahuan, khususnya dalam lingkup kedokteran gigi dan kesehatan masyarakat.

Dengan latar belakang akademik dan profesional yang kuat, penulis juga berperan aktif dalam pengembangan buku ajar dan bahan ajar lainnya. Keahlian beliau di bidang Patologi Mulut dan Maksilofasial menjadikannya salah satu akademisi yang berkompeten dalam mendukung kemajuan pendidikan kedokteran gigi di Indonesia

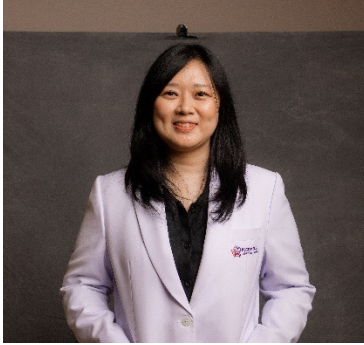


drg. Jessica Endriyana, M.Si meraih gelar dokter gigi dari Universitas Trisakti pada tahun 2018 dan gelar Magister of Science dari Universitas Indonesia pada tahun 2022. Saat ini, Jessica bertugas sebagai pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti.



Drs. Alfred Pakpahan, M.Si. menyelesaikan gelar sarjana Biologi dari Universitas Advent Indonesia pada tahun 1988 dan meraih gelar Magister Sains dalam bidang Biologi dari Institut Teknologi Bandung pada tahun 1994. Pengalaman mengajar Biologi, Imunologi, Embriologi, Radiobiologi dan Genetika di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti sejak

tahun 1994 hingga sekarang. Beliau juga mengajar Genetic Counseling dan Bioinformatika di Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti sejak tahun 2015 hingga sekarang. Disamping mengajar, beliau juga telah membimbing puluhan mahasiswa Kedokteran gigi. Dalam bidang pengembangan ilmu dan teknologi beliau banyak melakukan penelitian tentang ekstrak dari tanaman obat dan menjadi tim editor pada jurnal *Biology, Medicine, & Natural Product Chemistry* serta menjadi reviewer pada beberapa jurnal nasional maupun internasional. Beberapa hasil penelitiannya telah dipublikasi pada jurnal terindeks Scopus maupun Web of Science. Dalam bidang organisasi beliau aktif sebagai pengurus pusat Asosiasi Dosen Indonesia (ADI) dan pengurus Indonesian Association for the Study of Medicinals (IASMED).



drg. Priska Natassya, M.Si menyelesaikan Pendidikan profesi dokter gigi di Universitas Trisakti tahun 2012 dan memperoleh gelar Magister Sains (M.Si) dari Universitas Indonesia pada tahun 2022. Bidang minat dan kepakaran beliau meliputi biologi oral dan farmakologi, khususnya dalam kaitannya dengan pengembangan ilmu kedokteran gigi berbasis sains dasar serta penerapannya dalam praktik klinis.

Saat ini, beliau berperan sebagai dosen pada bagian Biologi Oral di Universitas Trisakti, serta aktif dalam kegiatan akademik dan pengembangan ilmu pengetahuan melalui pendidikan, penelitian, dan pengabdian kepada masyarakat. Fokus keilmuannya mencakup biologi jaringan oral, mekanisme kerja obat dalam kedokteran gigi, serta pendekatan preventif dan promotif dalam kesehatan gigi dan mulut.

Profil Editor



Afrinda Dwi Wahyuni, S.Si., M.T. meraih gelar Sarjana Biologi dari Universitas Airlangga dan gelar Magister Teknik dari Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Selama masa studinya, Afrinda mengembangkan minat yang kuat dalam bidang bioteknologi, khususnya stem cell, biologi sel, dan pengembangan terapi berbasis sel.

Afrinda memiliki pengalaman penelitian di laboratorium stem cell, dengan keterlibatan dalam isolasi, kultur serta eksplorasi potensi stem cell dan turunannya untuk aplikasi biomedis, termasuk dalam studi terkait kanker. Minat risetnya mencakup stem cell, biologi molekuler, biologi kanker, serta pengembangan pendekatan terapeutik inovatif berbasis sel.

Saat ini, Afrinda berkarier di *Prodia Education and Research Institute* dan aktif dalam penulisan serta penyuntingan karya ilmiah di bidang biomedis dan bioteknologi. Ia berkomitmen untuk mendukung publikasi ilmiah yang berkualitas melalui proses editorial yang kritis, sistematis, dan sesuai dengan standar akademik, serta berkontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

ANALISIS IMUNOHISTOKIMIA UNTUK PENDETEKSIAN BIOMARKER PROTEIN DALAM BIDANG KEDOKTERAN GIGI

Imunohistokimia (IHK) merupakan salah satu teknik penting dalam biomedis dan patologi diagnostik yang digunakan untuk mendeteksi dan memvisualisasikan ekspresi biomarker spesifik pada jaringan. Teknik ini berperan penting dalam membantu penegakan diagnosis, menentukan karakteristik tumor, serta mendukung perencanaan terapi pada berbagai penyakit, termasuk keganasan rongga mulut dan kepala-leher. Buku ajar ini disusun secara sistematis untuk mahasiswa kedokteran gigi dan bidang biomedis, serta praktisi kesehatan yang membutuhkan pemahaman komprehensif mengenai prinsip dan aplikasi imunohistokimia dalam praktik klinis.

Buku ini tidak hanya membahas prinsip dasar dan tahapan pemeriksaan imunohistokimia, tetapi juga dilengkapi dengan penjelasan mengenai marker imunohistokimia kunci pada tumor oral, interpretasi hasil pemeriksaan, serta aplikasi klinis dalam diagnosis dan manajemen pasien. Pembaca diharapkan tidak hanya memahami konsep teoretis, tetapi juga mampu mengaitkan hasil imunohistokimia dengan temuan klinis dan histopatologi secara terpadu.

Ditulis dengan pendekatan yang sistematis dan mudah dipahami serta dilengkapi dengan ilustrasi edukatif, buku ini menjadi referensi yang bermanfaat untuk kegiatan pembelajaran maupun praktik klinis. Buku ini diharapkan dapat membantu meningkatkan kemampuan mahasiswa dan tenaga kesehatan dalam melakukan deteksi dini, diagnosis, serta penatalaksanaan penyakit rongga mulut berbasis pendekatan molekuler.

ISBN 978-634-05-7093-9 (PDF)



9

786340

570939