

## Eksresi Bcl-2 pada Karsinoma Urotelial Kandung Kemih dan Hubungannya dengan Berbagai Faktor Prognosis

**Hendy Setyo Yudhanto, Budiana Tanurahardja, Puspita Eka Wuyung**

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia  
 RSUP Nasional Dr. Cipto Mangunkusumo  
 Jakarta*

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Karsinoma urotelial kandung kemih merupakan kasus terbanyak di organ kandung kemih mencapai 90% kasus. Stadium dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu non invasif jika belum menembus lapisan muskularis dan invasif jika sudah menembus lapisan muskularis. Kesintasan 5 tahun tergantung dari derajat keganasan dan stadium. Derajat keganasan rendah dan belum invasi muskuler dapat mencapai 90%, tetapi angka rekurensi berkisar 40-60%. Derajat keganasan tinggi dan sudah invasi hanya berkisar 10-17%. Mitosis dan invasi limfovaskuler berhubungan dengan angka rekurensi tinggi. Namun masih terdapat kontroversial terhadap ekspresi Bcl-2 pada karsinoma urotelial kandung kemih. Penelitian ini bertujuan untuk menilai perbedaan ekspresi Bcl-2 dengan 4 faktor yang berhubungan dengan prognosis yaitu derajat keganasan, stadium, mitosis, dan invasi limfovaskuler.

#### Metode

Dilakukan penelitian deskriptif analitik secara potong lintang pada karsinoma urotelial kandung kemih tahun 2010-2014 di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM. Didapatkan 21 kasus derajat keganasan rendah dan 21 kasus derajat keganasan tinggi. Dilakukan pulasan Bcl-2 pada seluruh kasus dan dihitung persentasenya dan dilakukan skoring 0-3.

#### Hasil

Usia terbanyak pada dekade 5 sebanyak 27 kasus. Didapatkan 4 kasus ditemukan invasi limfovaskuler. Penelitian ini mendapatkan hubungan antara mitosis dengan derajat keganasan ( $p:0,00$ ) dengan koefisien korelasi 0,512. Penelitian ini mendapatkan hampir seluruh kasus mengekspresikan Bcl-2 (39 dari 42 kasus), 1 kasus tidak mengekspresikan dan 2 kasus mengekspresikan sedikit. Tidak didapatkan perbedaan antara ekspresi Bcl-2 dengan derajat keganasan ( $p:0,232$ ), stadium ( $p:0,455$ ), mitosis ( $p:0,835$ ), dan invasi limfovaskuler ( $p:0,087$ ).

**Kata kunci:** derajat keganasan, ekspresi Bcl-2, invasi limfovaskuler, karsinoma urotelial, mitosis, stadium.

### ABSTRACT

#### Background

Urothelial carcinoma comprises of 90% of all cases in bladder. There are two groups which are non invasive depend on whether the tumor has reached muscularis mucosa. 5-Years survival rate depend on grading and staging. Low malignant grade and non invasive may reach 90% survival rate, with recurrence rate 40-60%. High malignant grade and invasive tumor has only 10-17% survival rate. Mitosis and lymphovascular invasion are related with recurrency. However, there are some controvesi regarding Bcl-2 expression in bladder urothelial carcinoma. This study was aimed to evaluate different expression of Bcl-2 with 4 related factors contributed to survival, which are degree of malignancy, stage, mitosis, and lymphovascular invasion.

#### Methods

A retrospective cross sectional study on urothelial carcinoma of the bladder was conducted in the Department of Anatomical Pathology, Faculty of Medicine, University of Indonesia/RSCM. The cases were collected from the year of 2010 to 2014. In this study 21 cases of low grade and 21 cases of high high grade were found. Bcl-2 immunohistochemistry staining performed in all cases and percentages are calculated to make 0-3 scoring.

#### Results

Most case is fifth decade as many as 27 cases. Obtained 4 cases found limfovaskuler invasion. This study obtains the relationship between mitosis with grade of tumor ( $p: 0.000$ ). the result suggests that there are no differences between the expression of Bcl-2 with the degree of malignancy stage, mitosis and lymphovascular invasion.

**Key words:** urothelial carcinoma bladder, degree of malignancy, stage, mitosis, limfovaskuler invasion, and Bcl-2 expression.

## PENDAHULUAN

Karsinoma urotelial kandung kemih merupakan keganasan yang berasal dari sel epitel transisional (urotelial).<sup>1-2</sup> Secara epidemiologi, karsinoma urotelial ini menduduki peringkat ke-7 pria dan ke-17 wanita dari seluruh kasus keganasan di dunia.<sup>1-3</sup> Data di Amerika Serikat, karsinoma urotelial menduduki peringkat ke-4 pada kasus kanker laki-laki dan peringkat ke-9 pada perempuan.<sup>3-4</sup> Data dari Badan registrasi kanker Indonesia, karsinoma urotelial ini menduduki peringkat ke-9 dari seluruh kasus kanker pada laki-laki dan ke-10 pada perempuan.

Insiden dari karsinoma sel urotelial kandung kemih berdasarkan *Surveillance, Epidemiology, and Result* (SEER) mengalami peningkatan setiap tahunnya, yaitu mencapai angka 20,5 kasus per 100.000 penduduk pada laki-laki dan 4,4 kasus per 100.000 penduduk pada perempuan.<sup>4</sup> Karsinoma urotelial kandung kemih sering timbul pada usia >65 tahun atau pada dekade 6.<sup>3-4</sup>

Karsinoma urotelial merupakan kasus terbanyak di kandung kemih mencapai 90%.<sup>3-6</sup> Gejala umum yang timbul pada kanker ini adalah hematuria. Pemeriksaan sitologi cairan urin dapat digunakan untuk mendeteksi kanker ini. Sensitivitas dan spesivitas pemeriksaan sitologi mencapai 80% dan 55%.<sup>7</sup> Secara klinik karsinoma ini sering menimbulkan masalah adanya rekurensi yang tinggi pada keganasan yang berada di superfisial maupun yang sudah stadium lanjut mencapai 30-40% kasus dalam 5 tahun setelah tindakan *Trans Urethral Resection Biopsy* (TUR-B).<sup>8</sup>

Prediksi rekurensi dan progresivitas keganasan ini masih didasarkan pada faktor prognosis yaitu derajat keganasan, stadium, ukuran, dan jumlah tumor.<sup>4</sup> Derajat keganasan pada karsinoma urotelial berdasarkan *World Health Organization* (WHO) membagi menjadi 2 kelompok yaitu karsinoma urotelial derajat rendah dan tinggi. Penentuan derajat keganasan karsinoma urotelial kandung kemih berdasarkan adanya anaplasia inti, struktur yang abnormal, sedangkan stadium berdasarkan invasi sel kanker ke lapisan yang lebih dalam.<sup>2,9</sup>

Beberapa faktor yang mempengaruhi prognosis antara lain derajat keganasan, stadium, metastasis kelenjar getah bening, dan metastasis jauh.<sup>8,10</sup> Derajat keganasan rendah memiliki angka kesintasan 5 tahun 70-80% sedangkan derajat tinggi turun menjadi kurang

dari 40%.<sup>10-12</sup> Namun derajat rendah memiliki masalah klinik yaitu angka rekurensi yang cukup tinggi sekitar 30-40%.<sup>8</sup>

Apoptosis atau kematian sel yang terprogram memiliki peran penting dalam karsinoma urotelial kandung kemih. Hilangnya respon apoptosis merupakan salah satu mekanisme tumor dalam perkembangan dan rekurensi. Pertumbuhan tumor tergantung dengan laju proliferasi sel neoplasma dengan jumlah sel yang apoptosis. Terjadinya gangguan pengontrol apoptosis merupakan hal yang penting dalam kehidupan sel yang dapat mengakibatkan kelainan secara genomik, tumorigenesis, dan ketahanan terhadap terapi kanker.<sup>6</sup>

Perubahan karsinoma urotelial kandung kemih diakibatkan oleh beberapa tahapan mulai dari aktivitas genetik yang berhubungan dengan aktifitas pembelahan sel dan apoptosis.<sup>6,13</sup> Kelompok protein yang berhubungan dengan perubahan karsinoma urotelial kandung kemih yaitu keluarga *B cell lymphoma 2* (Bcl-2), *cmyc*, *Hras*, *Apo-1*, dan *p53* berperan penting pada regulasi apoptosis.<sup>6</sup> Diketahui ekspresi berlebihan Bcl-2 pada kasus limfoma malignum, neuroblastoma, karsinoma pada prostat, paru dan payudara.<sup>6,14</sup> Ekspresi Bcl-2 berlebihan pada keganasan tersebut diketahui sebagai faktor prognostik baik dan juga memperburuk keadaan.<sup>6,12,14</sup> Pada limfoma dan neuroblastoma ekspresi Bcl-2 memiliki faktor prognostik yang buruk berbeda dengan karsinoma pada paru, prostat, dan payudara memiliki prognostik yang lebih baik.<sup>6</sup> Ekspresi yang berlebihan Bcl-2 pada karsinoma urotelial kandung kemih juga memiliki potensi sebagai patogenesis dan respon terhadap terapi.<sup>6,12,14</sup>

Faktor yang penting dalam menilai agretifitas dari karsinoma urotelial kandung kemih adalah aktivitas proliferasi. Perhitungan mitosis salah tehnik untuk menilai status proliferasi dari tumor.<sup>4,6</sup> Surbhi *et al*<sup>4</sup> mendapatkan bahwa mitosis dapat menjadi faktor independen sebagai faktor prognosis.

Rekurensi karsinoma urotelial kandung kemih berhubungan dengan ukuran tumor dan invasi limfovaskuler. Semakin besar ukuran (>5cm), semakin tinggi angka rekurensinya setelah TUR-B.<sup>11,15</sup> Laksmi, *et al*<sup>15</sup> mendapatkan bahwa invasi limfovaskuler merupakan faktor histologik yang dapat digunakan untuk mengevaluasi terapi yang digunakan. Selain itu juga metastasis kelenjar getah bening dan meta-

stasis jauh dapat ditemukan sekitar 10% dari kasus derajat keganasan tinggi. Menurut Mazzhucelli *et al*<sup>16</sup> ditemukannya invasi limfovaskuler sekitar 25-50% kasus sistektomi dan berhubungan dengan derajat keganasan.

Karsinoma urotelial kandung kemih merupakan model tumor dengan perilaku biologis yang unik sehingga meningkatkan keingintahuan terhadap proses karsinogenesis.<sup>6</sup> Parameter klinis dan histopatologik memiliki keterbatasan dalam menilai kekambuhan tumor, progresivitas tumor, maupun kelangsungan hidup pasien. Meskipun sudah ada kemajuan tehnik bedah, *disease free survival* selama 5 tahun masih dalam kisaran 50-60%.<sup>6</sup> Dengan demikian, stadium tumor adalah faktor prognosis morfologi yang paling penting dalam karsinoma kandung kemih urotelial yang ditentukan oleh kedalaman invasi ke dinding kandung kemih.<sup>4,6</sup> Meskipun stadium dan derajat keganasan merupakan hal penting dalam menentukan terapi, tetapi sering tidak dapat diprediksi resiko perkembangan menjadi karsinoma urotelial kandung kemih secara morfologi dan genetik tumor yang heterogen dengan berbagai jalur karsinogenesis.<sup>6</sup>

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi Bcl-2 pada karsinoma urotelial kandung kemih dihubungkan dengan faktor-faktor prognosis yaitu derajat keganasan, stadium, mitosis, dan invasi limfovaskuler.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian retrospektif dengan desain potong lintang. Penelitian dilakukan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia/RSCM. Populasi penelitian adalah kasus karsinoma urotelial kandung kemih di Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM sejak Januari 2010 hingga Desember 2014. Sampel dipilih secara konsekutif pada tiap kelompok yang diteliti pada kurun waktu yang ditentukan.

Karsinoma urotelial kandung kemih adalah karsinoma berasal dari urotel. Penentuan karsinoma urotelial kandung kemih derajat rendah dan tinggi berdasarkan gambaran morfologik yaitu dengan pleomorfisme inti ditemukan pada saat pemeriksaan histopatologi dengan pulasan hematoxilin dan eosin (HE).<sup>2</sup> Penentuan karsinoma urotelial non-invasi muskuler (pT1) dan invasi muskuler (pT2) berdasarkan ada atau tidaknya invasi sel kanker pada lapisan

muskularis.<sup>2</sup> Penilaian mitosis dilakukan dengan pulasan slaid H&E dengan perbesaran mikroskop 400x pada 10 lapang pandang yang berbeda. Dibagi menjadi 2 kelompok yaitu <5 mitosis per 10 lapang pandang dan  $\geq 5$  per 10 lapang pandang.<sup>8</sup> Penilaian invasi limfovaskuler dengan menggunakan slaid H&E dengan ditemukannya emboli tumor pada pembuluh darah pada pembesaran mikroskop 400x. Penilaian imunoekspresi Bcl-2 memberikan hasil positif bila terpulask coklat pada membran sitoplasma dan/atau sitoplasma. Negatif jika tidak terpulask coklat membran sitoplasma dan/atau sitoplasma.

Dilakukan pencarian kasus dengan menggunakan kode topografi C67.9 dan kode morfologi M8120/3 di bagian arsip Departemen Patologi Anatomi FKUI/RSCM. Kemudian diambil kasus derajat keganasan rendah dan derajat keganasan tinggi. Dilakukan pembacaan ulang slaid yang telah didapatkan oleh kedua peneliti. Setelah didapatkan sampelnya, dilakukan pencarian blok parafin.

Seluruh slaid yang telah dikumpulkan dibaca ulang oleh peneliti dan pembimbing bersama-sama untuk menentukan diagnosis sesuai dengan definisi operasional. Kemudian dilakukan metode pewarnaan imunohistokimia Bcl-2 *labeled streptavidin antibody binding* (LSAB): Jaringan pada blok parafin dipotong setebal 3 mikron dan diletakkan pada kaca benda yang telah dilapisi *poly-L-lysine* dan dilakukan preparasi sediaan dengan dilakukan pemanasan di atas *slide warmer* selama 60 menit dengan suhu 56,5-60° Celsius. Tahapan selanjutnya adalah deparafinisasi dengan menggunakan *xylol* sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan penggunaan alkohol dengan konsentrasi menu-run bertahap dimulai dari alkohol absolute konsentrasi 95% dan 80% masing-masing selama 5 menit. Setelah tahapan rehidrasi selesai, dilakukan pencucian slaid dengan air mengalir selama 5 menit, dilanjutkan dengan pencelupan ke dalam larutan endogen peroksidase 0,5% selama 30 menit, kemudian dibilas ulang dengan air mengalir selama 5 menit.

Setiap potongan jaringan dilakukan *antigen retrieval* selama 10 menit dalam *tris buffer* EDTA (pH 9) di dalam *microwave*, lalu didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit kemudian dicuci menggunakan *phosphate buffersaline* (PBS) selama 10 menit, lalu

inkubasi dengan *blocking agent* Sniper selama 30 menit. Dilanjutkan inkubasi dengan antibody primer *monoclonal mouse anti-human (Monoclonal mouse anti-human BCL-2 oncoprotein clone 124, Dako, Denmark)* BCL-2 dengan pengenceran 75 kali terlarut dalam serum dilakukan selama 1 jam dalam suhu ruangan, kemudian sediaan dicuci menggunakan PBS 10 menit. Dilanjutkan inkubasi antibody sekunder Universal Link selama 15 menit, kemudian dicuci menggunakan PBS selama 10 menit diikuti dengan Trekaavidin-HRP selama 15 menit pada suhu ruang. Langkah selanjutnya adalah pencucian ulang dengan PBS sebanyak 2x masing-masing selama 10 menit. Teteskan kromogen *diamino benzidine (DAB)* selama 20-30 detik, dilanjutkan dengan air mengalir. Dilakukan pencelupan ke dalam larutan *Hematoxillin Lillie Mayer* sebagai *counterstain* selama 1-2 menit kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya dilakukan pencelupan dalam lithium carbonat selama 1 menit, kemudian cuci dengan air mengalir. Langkah selanjutnya dilakukan dehidrasi dengan etanol dan *clearing* dengan *xylo*, terakhir ditutup dengan entelan.

Penilaian hasil pulasan imunohistokimia Bcl-2 dilakukan oleh dua orang peneliti untuk menilai seluruh kasus secara bersama. Pengamatan dilakukan pada daerah tumor yang mengekspresikan Bcl-2 pada sitoplasma. Jika terpulas di inti juga maka dihitung sebagai ekspresi negatif. Penghitungan dilakukan seluruh lapang pandang. Kemudian dilakukan penilaian skor 0 ekspresi Bcl-2 <1%, skor 1 ekspresi Bcl-2 1-10%, skor 2 ekspresi 10-50%, dan skor 3 >50% pada setiap sampel.

Dilakukan kategorik tidak berpasangan BxK dengan Kolmogorov-Smirnov pada setiap variabel yang dianalisis. Analisis antar variabel bebas dilakukan dengan *Pearson's rho*. Uji statistik ini menggunakan program SPSS 19. Penyajian data dilakukan dalam bentuk tabular dan tekstular.

**HASIL**

Sampel yang diambil dari pasien tumor ganas kandung kemih bulan Januari 2010-Desember 2014 didapatkan 424 kasus. Kasus karsinoma urotelial didapatkan 237 kasus, 39 kasus karsinoma urotelial kandung kemih derajat rendah namun yang memenuhi kriteria inklusi hanya 21 kasus. 10 kasus diekskusi karena

didapatkan fokus derajat tinggi dan 8 kasus tidak didapatkan blok parafin. Sehingga data yang dipakai 21 kasus derajat rendah dan 21 kasus derajat tinggi. Jumlah keseluruhan sampel adalah 42 kasus, dengan jumlah laki-laki lebih banyak yaitu 36 kasus dan usia terbanyak pada 50-60 tahun atau dekade 5 (Tabel 1 dan 2).

Pengambilan sampel terbanyak memakai tehnik TUR-B yaitu 37 kasus (Tabel 2). Penelitian ini mendapatkan hasil terbanyak sampel melalui TUR-B karena memiliki tingkat invasif yang lebih minimal dibandingkan dengan operasi sistektomi yang didapatkan hasil 5 kasus. Berdasarkan analisis statistik dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* antara usia dengan derajat keganasan, jenis kelamin dengan derajat keganasan, maupun pengambilan sampel dengan derajat keganasan tidak terdapat perbedaan ( $p>0,05$ ).

Tabel 1. Karakteristik dasar.

Indikator	Kasus derajat rendah	Kasus derajat tinggi	Total	Nilai p
Usia				0,983
30-40 tahun	1	1	2 (5%)	
41-50 tahun	1	3	4 (9%)	
51-60 tahun	15	12	27 (64%)	
61-70 tahun	3	4	7 (17%)	
71-80 tahun	1	1	2 (5%)	

Uji Kolmogorov-Smirnov nilai  $p<0,05$  menunjukkan secara statistik signifikan.

Tabel 2. Karakteristik antara pengambilan sampel dengan derajat keganasan.

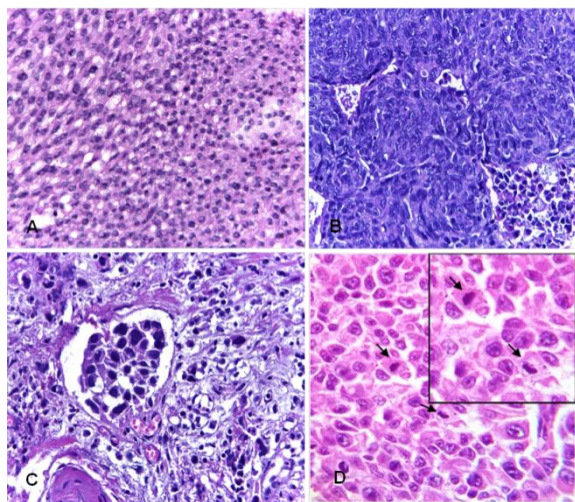
Indikator	Kasus derajat rendah	Kasus derajat tinggi	Total	Nilai p
Jenis kelamin				1,000
Laki-laki	18	18	36 (86%)	
Perempuan	3	3	6 (14%)	
Pengambilan sampel				0,343
TUR-B	20	17	37 (88%)	
Sistektomi	1	4	5 (12%)	
Total	21 (50%)	21 (50%)	42 (100%)	

Uji Kolmogorov-Smirnov nilai  $p<0,05$  menunjukkan secara statistik signifikan.

Stadium didapatkan yaitu pT1 sebanyak 19 kasus pada derajat keganasan rendah (Gambar 1) dan 10 kasus pada derajat keganasan tinggi (Gambar 1). pT2 didapatkan 2 kasus pada derajat keganasan rendah dan 11 kasus pada derajat keganasan tinggi. Didapatkan hasil 4 kasus terdapat invasi limfovaskuler pada kasus derajat keganasan tinggi (Gambar 1).

Semua didapatkan invasi limfovaskuler dengan pengambilan sistektomi.

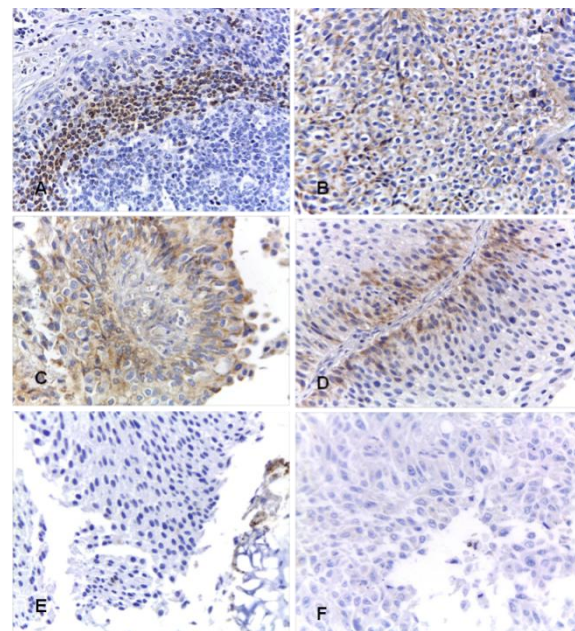
Dilakukan pemeriksaan mikroskopik dengan menggunakan pembesaran 400x pada seluruh sampel untuk menentukan jumlah mitosis dalam 10 lapang pandang. Didapatkan hasil 18 kasus kurang dari 5 mitosis pada kasus derajat dan 3 kasus lebih dari 10 mitosis pada kasus derajat keganasan rendah. Kasus derajat keganasan tinggi mendapatkan 8 kasus yang jumlah kurang dari 5 mitosis dan 13 kasus dengan jumlah lebih dari 5 mitosis. Hasil terbanyak mitosis didapatkan pada derajat keganasan tinggi. Berdasarkan stadium yang tertinggi mitosis didapatkan pada stadium 1 dengan derajat keganasan tinggi. Empat kasus yang didapatkan invasi limfovaskuler memiliki jumlah mitosis lebih dari 5.



Gambar 1. Karsinoma urotelial kandung kemih pembesaran 400x dengan pulasan H&E. A. Derajat keganasan rendah, B. Derajat keganasan tinggi, C. Invasi limfovaskuler, D. Mitosis (yang ditandai anak panah).

Setelah dilakukan pulasan imunohistokimia Bcl-2 pada seluruh kasus, kemudian dilakukan penilaian ekspresi Bcl-2 dengan menghitung jumlah sel yang terwarnai coklat pada sitoplasma pada seluruh lapang pandang. Kemudian dilakukan penilaian skor pada setiap kasus. (Gambar 2). Didapatkan gambaran positivitas yang lebih banyak pada basal pada hampir seluruh sampel. Derajat tinggi mendapatkan hasil lebih banyak positif ekspresi Bcl-2 pada seluruh bagian dari tumor sedangkan pada

kasus derajat rendah lebih banyak di basal. Namun penelitian ini juga mendapatkan kasus tidak mengekspresikan Bcl-2 pada derajat rendah maupun derajat keganasan tinggi.



Gambar 2. Ekspresi Bcl-2 pada pembesaran 400x. A. Kontrol positif; B. Ekspresi positif (sitoplasma) pada derajat keganasan rendah; C. Ekspresi positif (sitoplasma) pada derajat keganasan tinggi; D. Ekspresi Bcl-2 di basal; E. Derajat keganasan rendah; F. Derajat keganasan tinggi.

Penelitian ini mendapatkan hasil skor 0 dan 2 merupakan ekspresi Bcl-2 terbanyak yaitu 14 kasus (34%). Terbanyak kedua adalah skor 3 yaitu 9 kasus (21%). Sedangkan skor 1 sebanyak 5 kasus (11%). Derajat keganasan memiliki skor terbanyak pada deraja rendah yaitu 9 kasus skor 0, sedangkan derajat tinggi memiliki skor terbanyak 7 kasus pada skor 2 dan 3. Stadium 1 menunjukkan skor terbanyak yaitu 2 sebanyak 11 kasus, sedangkan stadium 2 memiliki skor 0 adalah kasus terbanyak. Penelitian ini tidak mendapatkan perbedaan ekspresi Bcl-2 dengan derajat keganasan (p:0,591), stadium (p:1,00), invasi limfovaskuler (p:0,427), dan mitosis (p:1,00) (Tabel 3).

Tabel 3. Analisa ekspresi Bcl-2 terhadap derajat keganasan, stadium, invasi limfovaskuler, dan mitosis.

Variabel	Skor				Total	Nilai p
	0	1	2	3		
Derajat keganasan						
Rendah	9	3	7	2	21	0,591
Tinggi	5	2	7	7	21	
Stadium						
pT1	10	3	11	6	30	1,00
pT2	4	2	3	3	12	
Invasi limfovaskuler						
Ditemukan	11	5	13	9	38	0,427
Tidak ditemukan	3	0	1	0	4	
Mitosis						
<5	6	2	8	3	19	1,00
≥5	7	3	7	6	23	

Uji Kolmogorov-Smirnov, nilai  $p < 0,05$  menunjukkan secara statistik signifikan.

Penelitian ini menganalisis perbedaan antara derajat keganasan, stadium, mitosis, dan invasi limfovaskuler. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mitosis terbanyak <5 pada kasus derajat rendah sedangkan mitosis >5 pada kasus derajat tinggi. Di dapatkan hasil yang memiliki hubungan adalah antara mitosis dengan derajat keganasan ( $p < 0,05$ ) dengan koefisien korelasi (0,512). Hasil ini menunjukkan hubungan yang sedang antara mitosis dengan derajat keganasan (Tabel 4).

Tabel 4. Hubungan mitosis antara derajat keganasan rendah dan tinggi.

Variabel	Mitosis		Total	Nilai p	Koefisien korelasi
	<5	≥5			
Derajat keganasan rendah	16	5	19	0,000**	0,512
Derajat keganasan tinggi	4	17	21		
Total	19	23	42		

\*\*Uji *Pearson's rho* nilai  $p < 0,05$  menunjukkan secara statistik signifikan.

**DISKUSI**

Didapatkan data seluruh kasus selama 5 tahun mulai tahun 2010-2014 di Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo kasus karsinoma urotelial kandung kemih sebanyak 237 kasus. Seluruh kasus didapatkan rentang usia 33-77 tahun dengan kasus terbanyak dekade 5. Hasil ini sedikit berbeda dengan penelitian lain yang mendapatkan usia terbanyak pada dekade ke 6.<sup>3,17</sup> Kasus terbanyak didapatkan pada derajat keganasan tinggi yaitu sekitar 198 (83,5%) kasus. Hasil ini berbeda dengan penelitian Ranu, *et al*<sup>17</sup> meneliti epidemiologi dari karsinoma urotelial kandung kemih selama 2 tahun di *Calcutta National Medical College and Hospital*

yang mendapatkan dari 88 kasus 24 kasus (27%) derajat keganasan tinggi. Hal yang mirip pada penelitian Pan *et al*<sup>8</sup> mendapatkan hasil dari 1.515 kasus 706 (47%) kasus adalah derajat keganasan rendah, 597 (39%) kasus derajat keganasan tinggi, dan sisanya 212 kasus adalah *papillary urothelial carcinoma low malignant potensial*. Kemungkinan yang bisa menyebabkan perbedaan adalah deteksi dini pada kasus karsinoma urotelial kandung kemih masih kurang dan gejala asimtomatik menyebabkan kasus terbanyak sudah stadium lanjut.

Invasi limfovaskuler ditemukan 4 kasus dari seluruh kasus. Invasi limfovaskuler ditemukan pada kasus pengambilan dengan operasi. Invasi limfovaskuler ditemukan sekitar 65% kasus karsinoma urotelial kandung kemih pada sistektomi.<sup>15-16</sup> Invasi limfovaskuler lebih dicari oleh patologi pada kasus yang berasal dari TUR-B.<sup>15</sup> Penelitian lain mendapatkan sedikit berbeda yaitu invasi limfovaskuler didapatkan pada 6% kasus pada reseksi kandung kemih maupun TUR-B.<sup>18</sup> Hal ini dapat dipengaruhi penatalaksanaan reseksi masih sedikit dibandingkan TUR-B. Penatalaksanaan TURB termasuk terapi yang lebih tidak invasif dibandingkan reseksi dan kasus terbanyak di penelitian lain adalah kasus derajat keganasan rendah sehingga terapi yang banyak digunakan adalah TURB.<sup>19</sup> Namun pada penelitian ini mendapatkan kasus meskipun banyak derajat keganasan tinggi namun reseksi masih lebih sedikit dari TURB.

Stadium didapatkan terbanyak pada pT1 adalah dengan derajat keganasan ringan, sedangkan pada kasus pT2 adalah derajat keganasan tinggi. Stadium secara mikroskopik hanya dapat ditentukan secara ada tidaknya muskulus pada saat pengambilan TUR-B maupun reseksi kandung kemih.<sup>19</sup> Penelitian lain mendapatkan hasil mirip yaitu kasus terbanyak adalah pT1 yaitu sudah menembus lamina propia namun belum menembus lapisan otot.<sup>9</sup> Penelitian ini juga mendapatkan 2 kasus pT2 pada kasus derajat keganasan rendah. Surbhi *et al*<sup>4</sup> mendapatkan hal yang mirip yaitu 1 kasus pT2 dan 2 kasus pT3 pada derajat keganasan rendah. Stadium merupakan parameter konvensional yang berhubungan penting mulai pemilihan terapi hingga menentukan kesintasan pasien. Setiap pT memiliki tata-laksana yang berbeda-beda yaitu pTa-pT1 dilakukan TUR-B dengan pengawasan ketat, pT2-pT3 dilakukan sistektomi dengan tambahan



kemoterapi, sedangkan pT4 hanya dilakukan kemoterapi dan radiasi.<sup>20</sup> Pengawasan ketat dilakukan karena potensi karsinoma urotelial kandung kemih memiliki rekurensi yang cukup tinggi selama 5 tahun yaitu pTa 31% dan pT1 33%. Tingginya rekurensi ini dimungkinkan karena karsinoma ini hampir multifokal.<sup>9</sup>

Selain stadium dan derajat keganasan yang sudah diketahui berhubungan dengan prognosis, dalam perkembangannya banyak faktor yang telah diteliti memiliki peran dalam menentukan prognosis salah satunya adalah mitosis.<sup>4,6,21</sup> Mitosis merupakan salah satu indikator yang berhubungan dengan prognosis, progresivitas, hingga kesintasan.<sup>9</sup> Mitosis ditemukan lebih banyak pada karsinoma urotelial derajat keganasan tinggi.<sup>4</sup> Dalam penelitian ini didapatkan mitosis terbanyak pada kasus derajat keganasan tinggi. Penelitian ini mendapatkan hasil didapatkan hubungan antara mitosis dengan derajat keganasan dengan koefisien korelasi sedang. Achile *et al*<sup>8</sup> mendapatkan pula prognosis dengan jumlah mitosis yang lebih dari 5 per 10 lapang pandang besar memiliki kemungkinan rekurensi 14 bulan dari terapi dibandingkan dengan jumlah mitosis kurang dari 5 yaitu 59 bulan. Surbhi *et al*<sup>7</sup> juga mendapatkan hasil yaitu jumlah mitosis memiliki korelasi dengan derajat keganasan, semakin tinggi derajat keganasan maka mitosis semakin tinggi.

Eksresi Bcl-2 didapatkan pada hampir semua kasus (65%). Hasil ini sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian lain yaitu ekspresi Bcl-2 sepertiga sampai setengah kasus dari seluruh kasus yang diteliti.<sup>4,11,22</sup> Ekspresi Bcl-2 lebih banyak didapatkan pada basal. Hal ini sesuai dengan ekspresi Bcl-2 banyak didapatkan di basal pada kasus normal maupun derajat rendah.<sup>9</sup> Ekspresi terendah didapatkan terbanyak pada derajat rendah. Penelitian lain mendapatkan hal yang sama yaitu mendapatkan hasil negatif meskipun nilai *cut off* dari ekspresi Bcl-2 1%.<sup>23</sup> Namun terdapat sedikit persamaan penelitian ini dengan penelitian lain yaitu ekspresi yang kuat dan tinggi pada kasus derajat keganasan tinggi.<sup>4,12,21</sup> Ekspresi yang tinggi ini dapat menimbulkan masalah utama yaitu penatalaksanaan yang kurang respon terhadap kemoterapi maupun radiasi.<sup>10,14,18,22,24</sup>

Bcl-2 melindungi sel tumor dari efek kemoterapi dan radiasi karena kemoterapi dan radiasi

menginduksi apoptosis dengan meningkatkan mekanisme pertahanan antioksidan.<sup>24</sup>

Tidak terdapat hubungan antara ekspresi Bcl-2 dengan mitosis. Penelitian lain mendapatkan hal yang sama yaitu tidak terdapat perbedaan bahkan korelasi antara jumlah mitosis dengan ekspresi Bcl-2.<sup>4,21</sup> Achile *et al*<sup>8</sup> meneliti tentang faktor proliferasi pada kasus *papillary urothelial neoplasm of malignant potential* (PUNLMP) dengan karsinoma urotelial kandung kemih derajat rendah, mendapatkan hasil dari ketiga tehnik yaitu penghitungan jumlah mitosis, pulasan AgNOR, dan pulasan imunohistokimia Ki-67 yang memiliki korelasi terhadap prognosis dan rekurensi adalah Ki-67. Surbhi *et al*<sup>7</sup> melakukan penelitian yang mirip yaitu mencari korelasi jumlah mitosis, AgNOR, dan Ki-67 dengan Bcl-2, mendapatkan hasil bahwa ketiga faktor tersebut memiliki korelasi dengan ekspresi Bcl-2 dan ketiga indikator tersebut memiliki potensi untuk menilai invasi otot.

Penelitian ini mendapatkan hasil tidak terdapat hubungan antara invasi otot (stadium) dengan ekspresi Bcl-2. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Li *et al*<sup>12</sup> yang mendapatkan hasil terdapat perbedaan ekspresi Bcl-2 tinggi pada karsinoma urotelial kandung kemih derajat tinggi dan sudah menginvasi otot dibandingkan dengan derajat rendah dan superficial. Penelitian tersebut juga mendapatkan hasil yang berbeda yaitu ekspresi Bcl-2 tinggi pada kasus displasia keras, tetapi ekspresi menurun pada karsinoma urotelial kandung kemih derajat keganasan rendah. Ekspresi Bcl-2 berbanding terbalik dengan ekspresi p53 yaitu pada kasus p53 mulai terekspresi pada kasus displasia dan meningkat sejalan dengan peningkatan derajat keganasan. Berbeda dengan hasil ini Shiina, *et al*<sup>25</sup> mendapatkan hasil ekspresi Bcl-2 banyak terdapat pada kasus yang normal dibandingkan dengan kasus karsinoma urotelial kandung kemih. Namun Wasan *et al*<sup>18</sup> meneliti mirip yaitu mencari korelasi Bcl-2 dan p53 pada karsinoma urotelial kandung kemih, mendapatkan hasil yaitu terdapat perbedaan ekspresi Bcl-2 antara kontrol( digunakan kasus sistitis) dengan karsinoma urotelial kandung kemih.

Eksresi Bcl-2 pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan antara derajat keganasan rendah dan tinggi. Berbeda dengan penelitian lain yang mendapatkan korelasi antara ekspresi Bcl-2 dengan derajat keganasan.<sup>4,21</sup> Namun

pada penelitian ini mendapatkan hasil yang berbeda dengan penelitian lain yaitu hampir seluruh kasus terekspresi Bcl-2. Ekspresi Bcl-2 yang tinggi berpengaruh dengan respon terapi yang menurun dengan kemoterapi dan kemoradiasi. Pollack, *et al*<sup>11</sup> meneliti tentang korelasi ekspresi Bcl-2 dengan respon kemoradiasi pada kasus karsinoma urotelial kandung kemih dengan invasif otot. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kasus dengan ekspresi Bcl-2 berlebihan menurunkan efek kemoradiasi, *disease free metastasis*, dan kesintasan 5 tahun. Penelitian tersebut menunjukkan ekspresi Bcl-2 berlebihan pada kasus karsinoma urotelial kandung kemih derajat keganasan tinggi (50 dari 107 kasus). Penelitian lain menunjukkan hasil ekspresi Bcl-2 sedikit bahkan sampai hanya beberapa kasus.<sup>21</sup>

Invasi limfovaskuler merupakan indikator penting dalam memprediksi metastasis pada semua keganasan. Penelitian ini menunjukkan tidak terdapat hubungan antara ekspresi Bcl-2 pada kasus dengan invasi limfovaskuler dan tanpa invasi limfovaskuler. Namun semua kasus yang ditemukan invasi limfovaskuler mengekspresikan Bcl-2. Hasil yang serupa dengan Pollack *et al*<sup>11</sup> menunjukkan bahwa 16 kasus dari 107 kasus terdapat invasi limfovaskuler dan yang mengekspresikan Bcl-2 sebanyak 9 kasus. Invasi limfovaskuler berhubungan dengan prognosis. Lopez, *et al*<sup>2</sup> menemukan bahwa pada 10% kasus reseksi ditemukan invasi limfovaskuler dan 4% kasus TUR-B. Penelitian tersebut juga menemukan pada pT1 dengan invasi limfovaskuler akan menurunkan kesintasan 5 tahun menjadi 44,4% dibandingkan dengan yang tidak ada invasi limfovaskuler yaitu 81%.<sup>26</sup>

**KESIMPULAN DAN SARAN**

Eksresi Bcl-2 65% pada kasus derajat keganasan rendah maupun tinggi. Tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi Bcl-2 pada karsinoma urotelial dengan derajat keganasan, stadium, mitosis, dan invasi limfovaskuler. Ekspresi Bcl-2 pada kasus karsinoma urotelial kandung kemih belum dapat dijadikan faktor prognosis pada penelitian ini. Dengan didapatkan ekspresi Bcl-2 yang tinggi pada kasus karsinoma kandung kemih derajat rendah, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut antara ekspresi Bcl-2 dengan tingkat rekurensi maupun kesintasan.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Epstein J. Lower urinary tract and male genital system In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J, editors. Robbins and Cotran Pathologic basic of disease, eight. Philadelphia: Elsevier Inc. 2010. p.971-1004.
2. Boltran A, Sauter G, Gasser T, Hartman A, Schmit-Drager B, Helpap B, *et al*. Infiltrating urotelial carcinoma In: Eble J, Sauter G, Epstein J, Sesterhenn I, editors. WHO Classification of Tumours of Pathologi and Genetics of Tumours of Urinary System and Male Genital Organ. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2002. p.89-109.
3. Colombel M, Soloway M, Akaza H, Bohle A, Palou J, Buckley R. Epidemiology, stadium, grading, and risk stratification of bladder cancer. J. Eur. J. Cancer. 2008; 44: 618-26.
4. Goyal S, Singh U, Sharma S, Kaur N. Correlation of mitotic AgNor count, Ki-67, and Bcl-2 with grade and stage in papillary urotelial bladder cancer. Uro J. 2014; 1: 1238-47.
5. Bethesda. SEER National cancer statistis factsheets: bladder cancer. National cancer institute(online). April 2014 (cited 10Oktober 2015). Available from: <http://www.seer.cancer.gov/statfact/html/urnbhtml>.
6. Enache M, Simionescu C, Lascu L. Ki67 and Bcl-2 immunoexpression primitive urotelial bladder carcinoma. RJME. 2012; 53: 521-5.
7. Xin W, Raab SS, Michael W. Low grade urothelial carcinoma: reappraisal of the citologic criteria on thinprep. Diagn Cytopathol. 2003; 29: 125-9.
8. Pich A, Chiusa L, Formiconi A, Galiano D, Bortolin P, Comino A, *et al*. Proliferative activity is the most recurrence in non invasive papillary urothelial neoplasm of low malignant potential and grade 1 papillary carcinoma of the bladder. Cancer. 2002; 95: 784-90.
9. Pan C, Chang Y, Chen K, Yu H, Sun C, Ho D. Prognostic significance of the 2004 WHO/ISUP classification for prediction of recurrence, progression, and cancer-specific mortality of non-muscle-invasive urotelial tumours of the urinary bladder. Am J Clin Pathol. 2010; 133: 788-95.
10. Maluf F, Cardo C, Verbel D, Sagatopan J, Boyle M, Herr H, Bajorin D. Assessing interactions between mdm-2, p53, and Bcl-2



- as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical treatment. *Ann Onc.* 2006; 17: 1677-86.
11. Pollack A, Wu C, Czernak B, Zagars G, Benedict W, Donelli T. Abnormal bcl-2 and pRb expression are independent correlates of radiatin respon in muscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 1823-9.
  12. Li B, Kanamaru H, Noriki S, Yamaguchi T, Fukuda M, Okada K. Reciprocal expression f bcl-2 and p53 oncoproteins in urothelial dysplasia and carcinoma of the urinary bladder. *Urol Res.* 1998; 26: 235-41.
  13. Theodorescu D. Molecular pathogenesis of urotelial bladder cancer. *Histol Histopathol.* 2003; 18: 259-74
  14. Kaur S. A single nucleotide polymorphism in BCL-2 gene determines the risk of urinary bladder cancer. *IOSR-JPBS.* 2014; 9: 6-13.
  15. Kunju L, You L, Zhang Y, Daignault S, Montie J, Lee C. Lymphovascular invasion of urothelial cancer matched transurethral bladder tumor and cystectomy specimens. *J Urol.* 2008; 180: 1928-32.
  16. Mazzuchelli R, Cheng L, Beltran A, Scarpelli M, Montironi R. Clinicopathological significance of lymphovascular invasion of urothelial carcinoma. *Anal Qu Cyt Histol.* 2012; 34: 173-9.
  17. Biswas R, Mangal S, Guha D, Basu K, Dilip K. An epidemiological study of cases of urothelial carcinoma of urinary bladder in tertiary care centre. *JKIMSU.* 2013; 2: 82-8.
  18. Tilki D, Shariat S, Lotan Y, Rink M, Karakiewicz P, Schoenberg M, *et al.* Lymphovascular invasion is indepently associated with bladder cancer recurrence and survival in patients with final stage T1 disease and negative lymph nodes after radical cystectomy. *BJU Int.* 2012; 111: 1215-21.
  19. Dorp F, Kausch I, Jocham D. Diagnosis and treatment of non-muscle-invasive urotelial carcinomas. *Dtsch Arzrebl.* 2007; 104: 797-802.
  20. Son S, Koo J, Choi S, Lee H, Lee Y, Song H, *et al.* Evalution of urine cytology in urothelial carcinoma patient: comparison of cellpreplus liquid-based cytology and conventional smear. *Kor J Pathol.* 2012; 46: 68-74.
  21. Senturk N, Aybek Z, Duzcan E. Ki-67, p53, Bcl-2, and bax expression in urothelial carcinomas of urinary bladder. *Turk J Pathol.* 2010; 26: 25-30.
  22. Matsumoto H, Wada T, Fukunaga K, Yoshihiro S, Matsuyama H, Naito K. Bax to Bcl-2 ratio and Ki-67 index are useful predictors of neoadjuvant chemoradiation therapy in bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2004; 34: 124-30.
  23. Ristic A, Velicovic L, Stokanovic D. Prognostic value of apoptotic activity in muscle-invasive bladder cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2011; 68: 511-4.
  24. Kong C, Zhang Z. Bcl-2 overexpression inhibits generation of intracellular reactive oxygen species and blkck adriamycib-induced apoptosis in bladder cancer cells. *As Pac J Cancer.* 2013; 14: 895-901.
  25. Shiina H, Igawa M, Urakami S, Honda S, Shirakawa H, Ishibe T. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 expression in transtitional cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 1996; 49: 395-9.
  26. Lopez J, Angulo J. The prognostic significance of vascular invasion in stage T1 bladder cancer. *Histopathol.* 1995; 27: 27-33.