

PERIODONTICS
CARCINOMA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**METILASI DNA PADA PATOGENESA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
(STUDI PUSTAKA)**

SKRIPSI

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



KG. 50/10
Sap
m

Oleh:

JEFRY WAHYUDI SAFRIL
020513599

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

LEMBAR PENGESAHAN

**METILASI DNA PADA PATOGENESA
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
(STUDI PUSTAKA)**

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi
pada Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga

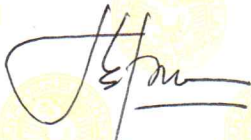
Oleh:

JEFRY WAHYUDI SAFRIL
020513599

Mengetahui / Menyetujui:

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II



Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M. Kes
NIP: 131 569 391



Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M Kes
NIP: 131 696 504

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan pada waktunya. Skripsi ini berjudul "**Metilasi DNA pada Patogenesis *Oral Squamous Cell Carcinoma***" yang disusun dalam rangka memenuhi prasyarat pendidikan dokter gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Keberhasilan dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari segenap bantuan dari berbagai pihak, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan rasa hormat kepada :

1. Prof. Dr. Ruslan Effendy, drg, M.Kes, Sp.KG selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Latief Mooduto, drg, MS, Sp.KG selaku Wakil Dekan 1 bidang Akademik dan Kemahasiswaan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
3. Dr. Jenny Sunariani, drg, MS, selaku Ketua Departemen Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
4. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg, M.Kes selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan inspirasi mengenai judul skripsi ini dan masukan serta saran yang berharga atas skripsi ini.
5. Dr. Theresia Indah Budhy S., drg, M.Kes selaku Dosen Pembimbing II yang juga telah memberikan bimbingan dan masukan yang berharga atas skripsi ini.

6. Dosen Penguji Skripsi : Muhammad Luthfi, drg, M.Kes, Susy Kristiani, drg, M.Kes dan Rinna Erlyawati S., drg, MS yang telah memberikan saran, tanggapan serta masukannya demi kesempurnaan skripsi ini.
7. Dr. Diah Savitri Ernawati, drg, M.Si selaku Dosen Wali yang telah banyak mendampingi dan membimbing penulis selama ini.
8. Kedua orang tua tercinta, Safril dan M. Asbay yang penuh perhatian, kasih sayang, kesabaran dalam menasehati dan selalu mendoakanku agar lulus dan menjadi orang yang sukses.
9. Ardhyah Purbaningsih sebagai teman tercinta yang telah memberikan penjelasan mengenai reaksi kimia dan saran untuk skripsi ini.
10. Adhib Abdul Hakim, Eva Nurmayanti, dan Dio Nella Arlingga sebagai sahabat terbaik yang senantiasa memberikan semangat, dukungan dan saran dalam penyelesaian skripsi ini.
11. Ganendra A., Nuzulul Ary, M. Ari Z., Ahmad, Dian Ayu, S. Umayasari dan Ayu Fitri L. sebagai teman-teman seperjuangan yang saling memberikan dukungan dalam penyelesaian skripsi.
12. Rekan-rekan di FKG khususnya angkatan 2005 dan semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini.
13. Untuk semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, terima kasih atas dukungannya selama ini.

BAB 1
PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN



1.1 Latar Belakang

Kanker rongga mulut secara konsisten termasuk salah satu dari 10 macam kanker yang tertinggi di dunia dengan distribusi yang relatif berbeda di setiap daerah (Jin Y & Jin C, 2006). Di Amerika Serikat, sekitar 30.000 penduduk menderita *oral squamous cell carcinoma* setiap tahun dan 90% diantaranya adalah perokok (Merck, 2005). Di Indonesia sejak 1987-1992 didapatkan sekitar 45,3 % tumor maligna dari total 2193 tumor rongga mulut dan rahang yang didiagnosa Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Hampir 71% tumor maligna adalah *squamous cell carcinoma*, sedangkan lainnya tumor kelenjar (21,5%) dan sarkoma (4,5%). Rasio berdasarkan jenis kelamin pria dan wanita yaitu 5,1 : 4,7. Insiden tumor maligna per 100.000 populasi dalam 6 tahun yaitu 2,64 %. Sedangkan, Insiden dari *squamous cell carcinoma* sekitar 2,1 % sehingga diperkirakan insiden akan terus meningkat setiap tahun. (Budhy S *et al*, 2001).

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) sering berkembang pada penderita dengan usia lebih dari 50 tahun dengan prevalensi tertinggi pada dekade ke-6 kehidupan. Kanker ini menunjukkan sekitar 5% terjadi pada pria dan 2 % pada wanita. Faktor resiko yang sering untuk kanker ini adalah paparan kronis tembakau dan alkohol. Sebagian lainnya, infeksi *Human Papilloma Virus (HPV)* terutama *HPV 16* dan *18* yang banyak ditemukan lebih dari 50% pada tonsillar dan *oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Telah diketahui, penderita dengan

OSCC dalam waktu lama beresiko terjadi tumor sekunder pada saluran pencernaan atas, ini dilaporkan terjadi pada 10-35% dari kasus yang ditemukan (Jin Y & Jin C, 2006).

Squamous Cell Carcinoma diketahui berasal dari perkembangan keratinisasi. Karakteristik *OSCC* yaitu terdapatnya *ceratin pearls* pada pemeriksaan histopatologi yang dibentuk dari ikatan desmosom dan intrasitoplasmik bundel keratin tonofilamen. Secara morfologi, *OSCC* bervariasi seperti plak, nodul, veruka dan dapat terjadi ulserasi yang menyebabkan tampak berwarna merah, putih atau coklat. Bibir merupakan tempat yang paling sering terjadi keganasan di rongga mulut yaitu 98% melibatkan bibir bawah, berikutnya lidah, dasar mulut, gingiva mandibula, bukal mukosa, palatum keras dan gingiva maksila (Torre J, 2006). Namun, terdapat data lain yang menyebutkan sekitar 40% *OSCC* bermula dari dasar mulut atau ventral atau lateral lidah. Sekitar 38% terjadi pada bibir bawah dan 11% bermula dari palatum dan tonsil (Merck, 2005).

Perkembangan dari *OSCC* merupakan proses bertahap yang membutuhkan perubahan akumulasi genetik yang dipengaruhi predisposisi genetik yaitu pengaruh lingkungan, termasuk tembakau, alkohol, inflamasi kronis dan infeksi virus. Perubahan genetik (tumorigenik) terdiri dari 2 tipe: *tumor supresor gen* dan *onkogen*. *Tumor supresor gen* merupakan gen yang menghambat proliferasi sel, sedangkan *onkogen* merupakan gen yang memicu proliferasi sel dan menyebabkan kanker. *Tumor supresor gen* dapat diinaktifkan dengan berbagai perubahan genetik seperti mutasi, kehilangan heterogenitas, atau modifikasi epigenetik seperti metilasi DNA atau perubahan struktur kromatin. *Onkogen* dapat diaktifkan oleh over-ekspresi akibat amplifikasi gen, peningkatan

transkripsi, atau perubahan struktur gen akibat mutasi (Choi S & Myers J.N., 2008).

Informasi tentang mutasi genetik telah lama diketahui, dapat berperan pada tumorigenesis, namun demikian saat ini telah berkembang paradigma baru sekitar 5 tahun terakhir yaitu bahwa peristiwa epigenetik juga memainkan peran penting dalam proses tersebut. Peristiwa epigenetik yang utama yaitu metilasi *cytosine residu* (CpG dinukleotida) (Guldberg J W P *et al*, 2002).

Metilasi DNA merupakan proses dimana grup metil menempel pada cytosine pada DNA yang terletak berdekatan dengan guanine. Metilasi yang terjadi pada sekuen -CG- pada gen spesifik akan menghambat transkripsi atau *silenced*. *Tumor supresor gen* merupakan gen spesifik yang sering di hambat oleh peristiwa metilasi. Fakta menunjukkan *tumor supresor gen* pada sel kanker di nonaktifkan oleh *epigenetic silencing*. Metilasi ini akan menyebabkan kehilangan fungsi *tumor supresor gen* dalam menghambat proliferasi sel sehingga sel akan terus tumbuh menjadi kanker. Oleh karena itu, metilasi menjadi penting dalam perkembangan kanker sebagaimana mutasi yang dapat menyebabkan kehilangan fungsi gen (Kleinsmith L J, 2006). Namun demikian sampai saat ini metilasi DNA dalam memicu kejadian kanker masih perlu penjelasan secara tuntas.

Kemajuan dalam perkembangan dan pemahaman *OSCC* didasarkan pada perubahan molekuler dapat berimplikasi untuk menegakkan diagnosa dini yang lebih akurat terhadap proses kejadian kanker *OSCC*. Selain itu, metilasi DNA juga dapat sebagai dasar pertimbangan dalam pengobatan secara biologi molekuler individual pada penderita tumor.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah metilasi DNA berperan terhadap patogenesis *oral squamous cell carcinoma* ?

1.3 Tujuan

Untuk memahami proses metilasi DNA pada patogenesis *oral squamous cell carcinoma*.

1.4 Manfaat

Sebagai wawasan ilmu di kedokteran gigi dalam memahami terjadinya metilasi DNA pada *oral squamous cell carcinoma* dan menambah informasi tentang perkembangan ilmu biologi molekuler yang mendasari tumbuh kembang suatu kanker rongga mulut.

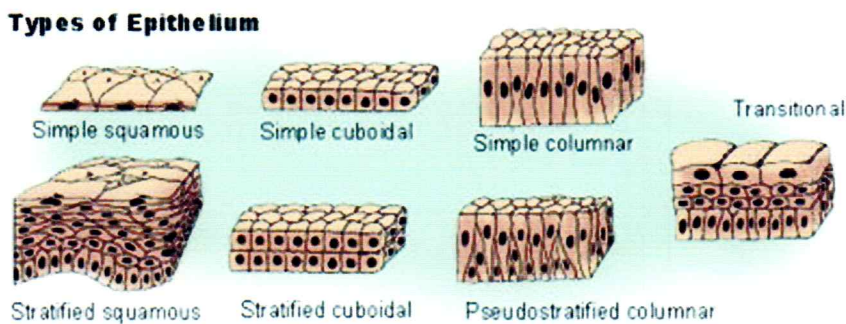
BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sel Skuamosa

Berdasarkan anatomi, skuamous epitelium berasal dari bahasa latin *squama* merupakan epitelium yang terdiri dari banyak lapisan superfisial, *scale-like cell* yang disebut sel skuamous. Epitelium dapat hanya memiliki satu lapisan sel, yang terbagi menjadi dua, yaitu *simple squamous epitelium* dan *stratified squamous epitelium* (lihat gambar 2.1). Kedua tipe ini menyebabkan perbedaan fungsi, mulai dari pertukaran nutrisi hingga perlindungan (Wikipedia, 2008).



Gambar 2.1 Tipe epitelium (Wikipedia, 2008).

Stratified squamous epitelium diklasifikasikan berdasarkan keberadaan keratin, yaitu:

1. *Non-ceratinizing stratified squamous epitelium* : kornea, rongga mulut, esofagus, rektum, vagina, dan bagian dalam bibir,
2. *Ceratinizing stratified squamous epitelium* : kulit, lidah (bagian berkeratin), dan bagian luar bibir,

Sekresi pada permukaan non-keratolitik menjadikan keadaan tetap basah, hal ini dapat mencegah kekeringan dan kematian sel. Sedangkan lapisan keratin berfungsi sebagai perlindungan dan menjaga keadaan permukaan agar tetap basah. (Wikipedia, 2008).

2.2 *Oral Squamous Cell Carcinoma*

2.2.1 Definisi

Tumor berasal dari *tumere* bahasa Latin, berarti bengkak merupakan salah satu dari lima karakteristik inflamasi. Namun, istilah ini digunakan untuk menggambarkan pertumbuhan jaringan biologis yang tidak normal (Weinberg M A *et al*, 2002). Pertumbuhannya dapat digolongkan sebagai ganas (*malignant*) atau jinak (*benign*). Tumor ganas disebut kanker dan memiliki potensi untuk menyerang dan merusak jaringan berdekatan serta metastasis. Tumor jinak tidak menyerang jaringan yang berdekatan dan tidak menyebabkan metastasis, tetapi dapat tumbuh secara lokal menjadi besar dan tidak rekuren (Wikipedia, 2008 ; Weinberg M A *et al*, 2002).

Squamous cell carcinoma merupakan tumor ganas yang sering terjadi pada struktur rongga mulut, yaitu 90% merupakan keganasan lesi rongga mulut (Gervasio O, 2001). *Squamous cell carcinoma* adalah keganasan epitel yang bersifat invasif dengan tingkat diferensiasi skuamous yang bervariasi di rongga mulut, terutama pada jaringan lunak termasuk mukosa alveolar dan gingiva, dasar mulut, lidah, palatum lunak dan keras, tonsil dan oropharyng (Jin Y & Jin C, 2006).

2.2.2.1 Tembakau

OSCC merupakan salah satu jenis kanker yang memiliki prevalensi tertinggi di sebagian dunia yang mempunyai tingkat konsumsi tinggi terhadap tembakau dan alkohol (Viswanathan M, 2003). Kanker rongga mulut telah lama dihubungkan dengan kebiasaan mengunyah tembakau bersama buah pinang (nginang) di India dan di beberapa Negara Asia. Di Negara barat, konsumsi rokok dan alkohol merupakan faktor resiko yang berperan terhadap kejadian *OSCC*. Penelitian kanker yang dilakukan agensi internasional (*International Agency Research of Cancer*) menyatakan bahwa merokok dengan segala bentuk tembakau bersifat karsinogenik pada manusia. Penggunaan tembakau bersama buah pinang akan meningkatkan paparan tembakau spesifik terutama *nitrosamine* yaitu derivat nitrosamine dari buah pinang. Selain itu, reaksi oksigen spesies (*ROS*) berimplikasi terhadap peningkatan tahap pembentukan kanker. Pro-karsinogen rokok misalnya *benzo-[a]-pirene* golongan *polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)* yang dimetabolisme oleh enzim oksidasi terutama *P450* menjadi metabolit aktif (Mehrotra R, 2006).

Hasil penelitian oleh Virtual 2008, menunjukkan ada hubungan antara dosis atau kadar dengan perkembangan kanker kepala dan leher. Lebih banyak merokok, maka resiko kanker menjadi lebih besar. Perokok yang merokok 25 kali lebih berpengaruh terhadap perkembangan kanker dibandingkan non-perokok. Selain perokok aktif, perokok pasif dan pengunyah tembakau, juga merupakan merupakan faktor resiko terhadap perkembangan kanker kepala dan leher.

2.2.2.2 Alkohol

Alkohol dan merokok merupakan dua hal yang sinergis yaitu berimplikasi pada karsinogenesis di rongga mulut (Mehrotra R, 2006). Hubungan kanker rongga mulut dengan konsumsi alkohol telah lama dilaporkan. Penelitian retrospektif epidemiologi menunjukkan karsinoma saluran pencernaan atas berhubungan erat dengan konsumsi alkohol, sedangkan karsinoma sistem pernapasan berhubungan erat dengan kebiasaan merokok. Bagaimanapun, konsumsi alkohol merupakan faktor yang lebih berpengaruh terhadap kejadian karsinoma rongga mulut dibandingkan merokok (Mashberg A *et al*, 2008). Alkohol dapat menyebabkan dan meningkatkan penetrasi senyawa karsinogen ke dalam jaringan target. Asetildehid merupakan metabolit alkohol yang telah diidentifikasi sebagai promotor tumor (Mehrotra R, 2006).

Konsumsi alkohol sering dikaitkan dengan hubungan antara dosis atau kadar dengan perkembangan kanker kepala dan leher yaitu pemabuk berat merupakan faktor resiko yang lebih berpengaruh. Selain itu, peminum alkohol mungkin lebih berpengaruh besar bila dibandingkan dengan orang yang meminum anggur (Virtual Cancer Center, 2008).

2.2.2.3 Infeksi Virus

Infeksi kronis virus telah dihubungkan dengan kejadian kanker rongga mulut. *Epstein-Barr Virus* sering dihubungkan dengan perkembangan kanker nasopharyng. *Human Papilloma Virus*, *Herpes Simplex Virus* and *Human Immunodeficiency Virus* juga berpengaruh pada perkembangan beberapa tumor

rongga mulut melalui interfensi fungsi *tumor supresor gen* dan *onkogen* (Virtual Cancer Center, 2008).

Infeksi *Human Papilloma Virus (HPV)* erat hubungannya dengan perkembangan tumor jinak maupun ganas pada lesi rongga mulut. Virus ini di deteksi pada condyloma, fokal epitel hiperplasia, papilloma sel skuamous, dan keganasan di rongga mulut. *HPV* positif ditemukan di rongga mulut (59%), pharing (43%) dan laring (39%) (Mehrotra R, 2006). Para ahli telah meneliti bahwa lebih dari 50% kanker pada tonsil disebabkan karena infeksi *HPV* (Wikipedia, 2008). Tidak semua *HPV* berperan pada transformasi ke arah keganasan, namun hanya beberapa subtipe *HPV*, yaitu *HPV 16* dan *HPV 18*. (Mehrotra R, 2006).

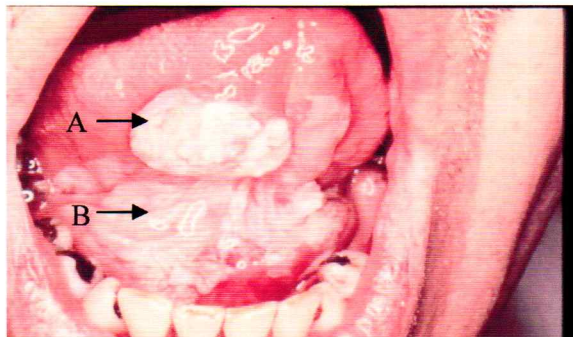
2.2.2.4 Faktor Resiko Lain

Faktor resiko lain pada kejadian *OSCC* adalah defisiensi imun pada keadaan seperti setelah transplantasi, paparan dari lingkungan kerja seperti asbestos dan perchloroethylene, radiasi, diet (nutrisi), kebersihan mulut yang jelek, predisposisi genetik (Virtual Cancer Center, 2008). Selain itu, trauma kronik, obat *immunosuppression*, sinar ultraviolet, infeksi candida, penyakit siphilis juga faktor resiko yang berimplikasi pada pertumbuhan kanker di dalam rongga mulut (Soames J V & Southam J C, 1998).

2.2.3 Gambaran Klinis

Lebih dari 90-95% kanker rongga mulut yaitu *OSCC* dengan bentuk khas massa yang persistensi, nodula, atau indurasi ulser. Tiga tempat anatomi yang terkait adalah lidah, bibir, dan dasar mulut. *OSCC* dapat berkembang dari lesi prekanker, seperti leukoplakia dan eritroplakia, atau tampak sebagai epitel normal (Jin Y & Jin C, 2006).

Gambaran klinis *OSCC* pada stadium awal sering tidak menunjukkan gejala yang jelas, tidak ada keluhan dan tidak sakit. Dapat diawali dengan leukoplakia, eritroplakia maupun erosi. Apabila leukoplakia dibiarkan dan tidak dirawat, dapat berubah menjadi *oral squamous cell carcinoma* dengan kecepatan pertumbuhan yang cepat (lihat gambar 2.3). Seperti kanker rongga mulut yang lain, *OSCC* dapat bermetastase dari rongga mulut ke lymphanodes submandibular dan servikal (Weinberg M A *et al*, 2002).



Gambar 2.3 Gambaran klinis leukoplakia yang berubah menjadi *Oral Squamous Cell Carcinoma* (Merck, 2005).

Keterangan : A; *Oral Squamous Cell Carcinoma*.
B; Leukoplakia.

Pada stadium lanjut berupa dungkul yang eksofitik ataupun noduler meninggi dan dapat berupa ulser dengan indurasi yang tidak dapat sembuh (Merck, 2005). Permukaan lesi kasar berupa granular dengan tepi tidak teratur, warna dapat heterogen dari warna putih, merah muda, dan merah. Apabila lesi membesar dapat terasa sakit dan mudah berdarah (Soegiarti, 2001).

Secara klinis lesi *OSCC* dapat diklasifikasikan sebagai lesi yang eksofitik atau papiler dan nodula, kedua tipe ini memberikan gambaran yang khas ulser karsinoma dan pengerasan jaringan dari bagian yang mengalami keganasan. Pinggiran lesi terlihat sedikit menonjol membulat yang melekat erat ke jaringan sekitar dan ke struktur yang lebih dalam. Dasar lesi terdiri atas jaringan nekrose yang memutih dan rapuh serta mudah berdarah (Rahmadsyah, 2001).

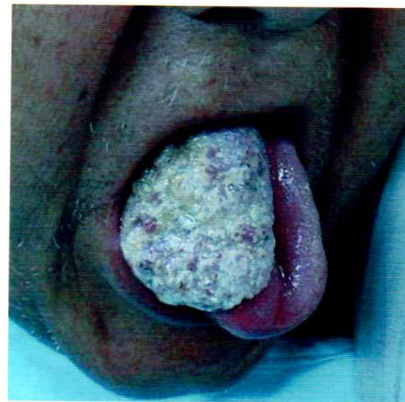
Menurut Regezi dan Sciubba (1993) ada dua gambaran klinik, yaitu:

1. Bentuk endofitik umumnya ulseratif berbentuk ulkus yang permukaannya berkerak (*Crusted ulcer*) maupun yang tidak berkerak, dapat terjadi superfisial atau dalam seperti kawah. Bentuk lain berupa lesi yang meninggi dengan ulserasi pada bagian tengah dengan pinggiran membulat. Dapat berupa lesi kemerahan yang permukaannya sedikit meninggi dan halus (*Velvety red area*),
2. Bentuk eksofitik berbentuk dungkul dengan dasar lebar (bertangkai lebar), sedangkan permukaan lesi berpapil-papil mirip bunga kol (*Cauli Flower*) (lihat gambar 2.4).

Berdasarkan lokasi, karsinoma sel skuamosa dibagi menjadi :

1. Karsinoma bibir, yaitu lesi muncul pada batas merah bibir dan tampak sebagai ulser kronis yang tidak menyembuh atau sebagai lesi eksofitik,

2. Karsinoma lidah, memberikan gambaran klinis yang khas yaitu ulser yang tidak menyembuh dan terindurasi. Lokasi terbanyak di penggir lateral posterior lidah,
3. Karsinoma dasar rongga mulut, sering kali tampak sebagai lesi ulser yang tidak menyembuh, indurasi, dan tidak nyeri. Mungkin tampak sebagai bercak putih atau merah, kadang-kadang lesi menginfiltrasi jaringan lunak dari dasar mulut dan menyebabkan penurunan gerakan lidah,
4. Karsinoma mukosa bukal dan gingiva, pada penampakan klinis bervariasi dari bercak putih ke ulser yang tidak menyembuh sampai lesi eksofitik,
5. Karsinoma palatum, relatif jarang ditemukan, asimtomatik, plak putih atau merah atau berbentuk sebagai massa yang ulseratif dan keratolitik.

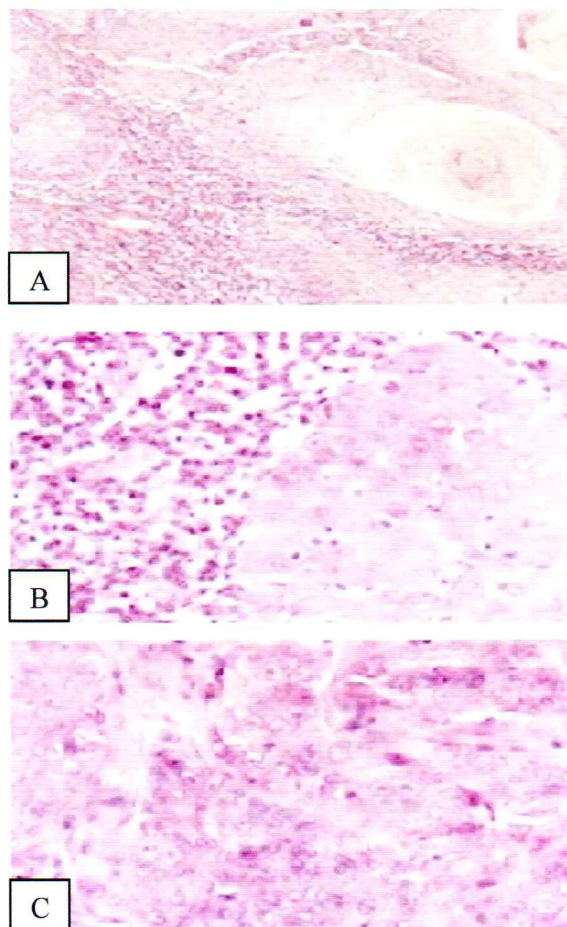


Gambar 2.4 *Squamous Cell Carcinoma* berukuran besar pada lidah
(Wikipedia, 2008).

2.2.4 Histopatologik

Secara histopatologik, dapat dikategorikan menjadi tiga derajat differensiasi (lihat gambar 2.5) (Jin Y & Jin C, 2006) :

1. *Well differentiated* menunjukkan karakteristik lebih dari 75% keratinisasi,
2. *Moderately differentiated* menunjukkan karakteristik dari 25%-75% keratinisasi,
3. *Poorly differentiated* menunjukkan karakteristik kurang dari 25 % keratinisasi.



Gambar 2.5 Gambaran histopatologik *Oral Squamous Cell Carcinoma* mukosa bukal rongga mulut (Fabricio L V *et al*, 2008).

Keterangan : A; *Well differentiated*.
B; *Moderately differentiated*.
C; *Poorly differentiated*.

Derajat diferensiasi ini yang merubah satu tahapan tumor ke tahapan berikutnya. Tahapan tumor dapat dibagi berdasarkan klasifikasi sistem TNM. TNM merupakan singkatan dari T yaitu *tumor size* atau ukuran tumor, N yaitu *node* atau penyebaran ke kelenjar getah bening regional dan M yaitu *metastase* atau penyebaran jauh (Wikipedia, 2008).

Tabel 2.1 Tahapan Tumor (National Cancer Institute, 2004).

Tahapan	Definisi
<i>Stage 0</i>	<i>Carcinoma in situ</i> (permulaan suatu kanker yang hanya terlihat pada lapisan sel di mana kanker itu tumbuh),
<i>Stage I, Stage II dan Stage III</i>	Tumor yang berukuran besar, penyebaran kanker ke <i>lymph nodes</i> dan organ yang berdekatan dengan tumor primer,
<i>Stage IV</i>	Kanker telah menyebar ke organ lain yang jauh dari tumor primer.

2.3 Metilasi DNA

2.3.1 Metilasi

Metilasi merupakan istilah di dalam ilmu kimia yang menunjukkan perlekatan atau peristiwa substitusi grup metil pada berbagai substrat. Grup metil di dalam bidang kimia yaitu grup alkil hidrofobik fungsional dengan formula $-CH_3$. Grup metil juga bersifat lipofilik sehingga mudah terabsorpsi kedalam membran biologi (Wikipedia, 2008).

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih banyak kekurangannya. Namun demikian penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Surabaya, Juli 2009

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
KETERANGAN SINGKATAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Sel Skuamosa	5
2.2 <i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>	6
2.2.1 Definisi	6
2.2.2 Faktor predisposisi	7
2.2.2.1 Tembakau	8
2.2.2.2 Alkohol	9
2.2.2.3 Infeksi Virus	9
2.2.2.4 Faktor Resiko Lain	10

2.2.3	Gambaran Klinis	11
2.2.4	Histopatologik	14
2.3	Metilasi DNA	15
2.3.1	Metilasi.....	15
2.3.2	Definisi Metilasi DNA	16
2.3.3	<i>CpG Island</i>	17
2.3.4	DNA Metiltransferase	18
2.3.5	<i>S-adenosil methionin</i>	20
2.3.6	Hipermetilasi	21
2.3.7	Hipometilasi	24
2.4	Karsinogenesis Karsinoma Sel Skuamous Rongga Mulut.....	25
2.5	Implikasi Metilasi DNA.....	27
2.6	Gen yang Mengalami Metilasi DNA	31
BAB 3	KERANGKA KONSEP	33
BAB 4	PEMBAHASAN	36
BAB 5	KESIMPULAN DAN SARAN	46
5.1	Kesimpulan.....	46
5.2	Saran	46
DAFTAR PUSTAKA.....		47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tipe epitelium	5
Gambar 2.2	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> pada <i>alveolar ridge</i>	7
Gambar 2.3	Gambaran klinis leukoplakia yang berubah menjadi <i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>	11
Gambar 2.4	<i>Squamous Cell Carcinoma</i> berukuran besar pada lidah	13
Gambar 2.5	Gambaran histopatologik <i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i> mukosa bukal rongga mulut.....	14
Gambar 2.6	Grup metil	16
Gambar 2.7	Reaksi metilasi DNA yang dikatalisasi DNA Metiltransferase (DNMT)	19
Gambar 2.8	Struktur Kimia <i>S-adenosil methionin</i>	20
Gambar 2.9	Regulasi asam folat, metilasi cytosin, dan <i>gen silencing</i>	20
Gambar 2.10	Akumulasi perubahan genetik dan epigenetik dalam tahapan karsinogenesis.....	26
Gambar 2.11	Ekspresi mRNA pada sel normal dan sel kanker.....	28
Gambar 2.12	Overekspresi DNMT1 terkait dengan <i>poor prognosis</i> penderita.....	29

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Tahapan tumor	15
Tabel 2.2	Gen yang mengalami metilasi pada kanker manusia dan peran metilasi DNA pada perkembangan tumor	23

KETERANGAN SINGKATAN

ATP	: Adenosin trifosfat
CDK	: <i>Cyclin dependent kinase</i>
CpG	: <i>Cytosin phosphate Guanin</i>
DHF	: <i>Dihydrofolate</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nuclei Acid</i>
DNMT	: DNA metiltransferase
dTMP	: <i>deoxythymidine monophosphate</i>
dUMP	: <i>deoxyuridine monophosphate</i>
HDAC	: Deasetilase histon
HPV	: <i>Human papilloma virus</i>
MBD	: <i>Methyl-CpG-binding domain protein</i>
MeCP	: <i>Proteins binding methylated cytosine</i>
MGMT	: <i>O₆-metilguanin DNA metiltransferase</i>
MSP	: Metilasi spesifik PCR
MTHFR	: <i>Metilentetrahydrofolate reductase</i>
OSCC	: <i>Oral squamous cell carcinoma</i>
PAH	: <i>Polycyclic aromatic hidrocarbon</i>
PCNA	: Antigen nuclear proliferasi sel
PCR	: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribose Nuclei Acid</i>
ROS	: Reaksi Oksigen Spesies

SAH : *S-adenosil homocystein*
SAM : *S-adenosil methionin*
Si RNA : *Small interference RNA*
THF : *Tetrahydrofolate*
TNM : *Tumor Node Metastase*
TSA : *Trichostatin A*



Gambar 2.6 Grup metil (Wikipedia, 2008).

Di bidang sistem biologi, metilasi dikatalisasi oleh enzim, contoh metilasi yang terkait modifikasi logam berat, regulasi ekspresi gen, regulasi fungsi protein dan metabolisme RNA. Metilasi berperan penting dalam peristiwa epigenetik, yang dapat terjadi pada DNA ataupun protein (Wikipedia, 2008; Sulewska A, 2007).

2.3.2 Definisi Metilasi DNA

Metilasi DNA adalah modifikasi kovalen kimia, terdapat penambahan grup metil (-CH₃) pada karbon 5 posisi cincin cytosin. Bagaimanapun cytosin metilasi terjadi pada rangkaian 5'CG3' (disebut juga *CpG dinukleotid*, "p" di *CpG* adalah fosfodiester diantara cytosin dan guanisin). Daerah kecil pada DNA yang banyak mengandung *CpG* disebut *CpG island* di mana dimiliki kira-kira separuh dari gen manusia dan secara umum tidak mengalami metilasi (Das P M & Singal R, 2004).

Metilasi sebagai peristiwa epigenetik terjadi pada tempat *CpG* (tempat cytosin-fosfat-guanin, dimana cytosin secara langsung diikuti oleh guanin pada rangkaian DNA), menghasilkan perubahan cytosin menjadi 5-metilcytosin. Formasi metilasi pada *CpG* dikatalisasi oleh enzim DNA metiltransferase. Metilasi pada *CpG* dapat mengakibatkan pengaruh besar terhadap hilangnya aktifitas atau ekspresi gen (Wikipedia, 2008).

2.3.3 CpG island

CpG island adalah daerah di DNA yang memiliki kadar *CpG site* yang lebih tinggi. Banyak gen mamalia mempunyai *CpG island* yang berhubungan dengan permulaan gen. Oleh Karena itu, kehadiran *CpG island* digunakan untuk membantu prediksi dan keterangan mengenai gen (Jones and Bartlett, 2005). Pada gen mamalia, *CpG island* terdiri dari 300-3000 pasang basa. *CpG* terdapat pada kira-kira 40% promoter gen mamalia (sekitar 70% pada promoter manusia) (Fatemi M, 2005).

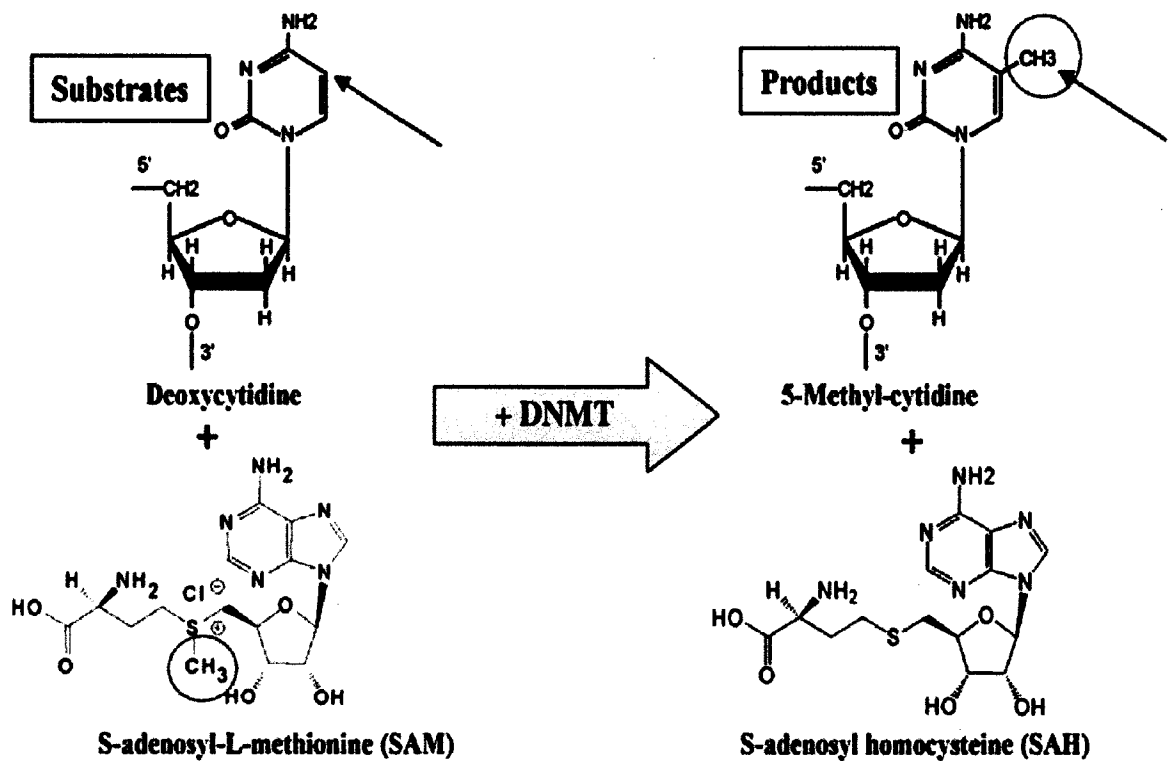
CpG island merupakan tempat terjadi atau dekat dengan daerah permulaan transkripsi gen dan *CpG* sebagai *housekeeping* gen pada vertebrata. Secara normal C (cytosin) diikuti oleh G (guanin), *CpG* merupakan hal yang langka di DNA vertebrata karena cytosin sering mengalami metilasi. Bagaimanapun metilasi cytosin akan mengakibatkan perubahan menjadi timin oleh karena deaminasi spontan. Hasil penelitian *CpG* relatif langka kecuali pada beberapa daerah tidak termetilasi karena alasan tertentu, kemungkinan berkaitan dengan regulasi ekspresi gen (Saxonov S, 2006).

Peningkatan kadar *CpG* yang dihubungkan dengan penurunan metilasi cytosine diteliti pada *CpG island* menunjukkan bahwa kemungkinan terjadi pengurangan kejadian transisi mutasi (Jones and Bartlett, 2005). Walaupun secara normal *CpG island* terlindungi dari metilasi DNA, tetapi penyimpangan metilasi dapat terjadi selama tahapan karsinogenesis dan penuaan (Kato, Keizo *et al*, 2006).

Metilasi pada area *CpG* berkaitan dengan *gen promoter* yang berperan penting terhadap kehilangan ekspresi gen (*silencing*), yang biasa ditemukan pada kanker (misalnya *silencing tumor supresor gen*). Secara nyata, hipometilasi telah dihubungkan dengan overekspresi *onkogen* pada sel kanker (Jones PA, Laird PW, 1999).

2.3.4 DNA Metiltransferase

Metiltransferase adalah tipe enzim transferase yang mentransfer grup metil dari donor ke aseptor. Metiltransferase menggunakan grup metil pada *S-adenosil methionin (SAM)* sebagai donor (lihat gambar 2.7). Metilasi DNA digunakan untuk menghambat dan meregulasi gen tanpa merubah rangkaian DNA. Metilasi terjadi pada residu cytosin. Metilasi DNA dibutuhkan untuk pertumbuhan normal dari tahap embrionik pada mamalia, namun metilasi juga dihubungkan dengan perkembangan kanker yaitu berkaitan dengan *tumor supresor gen*, promoter tumorigenesis dan metastasis (Wikipedia, 2008).

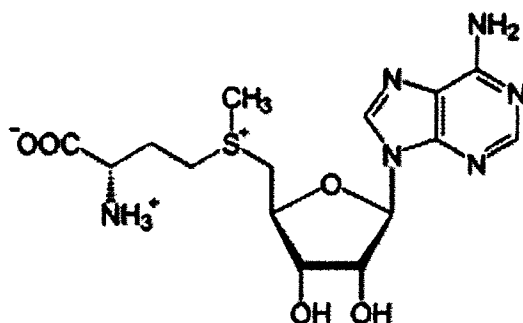


Gambar 2.7 Reaksi metilasi DNA yang dikatalisasi DNA Metiltransferase (DNMT) (Sulewska A, 2007).

DNA Metiltransferase (DNMT) sekarang telah diidentifikasi antara lain : DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3b, dan DNMT3L. Metilasi *de novo* (yaitu CpG dinukleotid pada DNA *double strand* yang belum termetilasi) atau pemeliharaan (CpG dinukleotid pada DNA *one strand* yang termetilasi). DNMT1 *de novo* sebagai pemeliharaan aktifitas dari metiltransferase, dan DNMT3A dan DNMT3b sebagai enzim metiltransferase yang sangat kuat (Das P M & Singal R, 2004).

2.3.5 *S*-adenosil methionin

S-adenosil methionin (*SAM*) merupakan koenzim yang terlibat dalam transfer metil grup (Gambar 2.6). *SAM* pertama kali ditemukan di Italia oleh G. L. Cantoni tahun 1952 dan dibuat dari adenosin trifosfat (ATP) dan *methionin* oleh *methionin* adenosiltransferase (lihat gambar 2.8). Transmetilasi, transsulfurasi dan aminopropilasi merupakan jalur metabolisme yang digunakan *SAM*. Reaksi anabolik ini terjadi di seluruh jaringan di dalam tubuh (Roje S, 2006).



Gambar 2.8 Struktur kimia *S*-adenosil methionin (Wikipedia 2008).

Grup metil melekat pada atom *methionin sulfur* dan merupakan reaksi secara kimia. Cara ini yang digunakan untuk mendonasi grup metil ke substrat aseptor pada reaksi transmetilasi. Lebih dari 40 reaksi metabolik meliputi transfer grup metil dari *SAM* ke berbagai substrat seperti asam nukleat, protein, dan lipid (Wikipedia, 2008).

Reaksi untuk menghasilkan, menghabiskan, dan memperbaharui *SAM* disebut siklus. Pada tahap pertama, *SAM-dependent metilase* menggunakan *SAM* sebagai substrat menghasilkan *S-adenosil homocystein (SAH)* (Finkelstein J & Martin J, 2000). *SAH* dihidrolisis menjadi *homocystein* dan *adenosin* oleh *S-adenosilhomocystein hidrolase* dan *homocystein* akan digunakan

kembali menjadi *methionin*. *Methionin* dapat dikonversi kembali menjadi *SAM* (Fodinger M *et al*, 2000).

2.3.6 Hipermetilasi

Pada proses kejadian kanker, terjadi gangguan yang disebabkan oleh fenomena yang menarik yaitu hipermetilasi pada area regulasi *CpG island* (Esteller M, 2003). Daerah promoter pada sebagian besar gen manusia mengandung bidang yang kaya *CpG* pada DNA dan dikenal sebagai *CpG island* (Volkers N, 2000).

Hipermetilasi *CpG island* ditemukan pada beberapa *tumor supresor gen*, seperti *BRCA1*, *hMLH1*, *p16INK4a*, *APC*, *VHL*, yang mengakibatkan inaktivasi dari gen tersebut (Esteller M, 2003). Penelitian hipermetilasi telah banyak dilaporkan dibandingkan hipometilasi, yaitu mengenai mekanisme untuk mencegah hipermetilasi pada daerah *CpG*, antara lain transkripsi aktif, demetilasi aktif dan struktur lokal kromatin untuk mencegah akses ke DNA metiltransferase (Das P M & Singal R, 2004).

Hipermetilasi juga terjadi pada *tumor supresor gen* pada penelitian beberapa kanker manusia, antara lain: *BRCA1*, *E-cadherin*, *p16*, *DAP-kinase*, *hMLH-1*, dan *tumor supresor gen* lainnya pada kanker payudara, ovarium, kepala dan leher dan endometrium. Hipermetilasi pada spesifik *tumor supresor gen* telah ditemukan 10-60% dari tumor yang telah diteliti (Volkers N, 2000).

Saat ini, beberapa gen telah diidentifikasi mengalami hipermetilasi pada kanker. Berikut gen yang terkait dengan regulasi siklus sel ($p16^{INK4a}$, $p15^{INK4a}$, Rb, p^{14ARF}), yang berhubungan dengan perbaikan DNA (BRCA, *MGMT*), apoptosis (DAPK, TMS1), detoksifikasi, differensiasi, angiogenesis, dan metastasis kanker (lihat tabel 2.2) (Das P M & Singal R, 2004).

Tabel 2.2 Gen yang mengalami metilasi pada kanker manusia dan peran metilasi DNA pada perkembangan tumor (Das P M & Singal R, 2004).

Gen	Peran Pada Tumor	Tempat Tumor
BRCA1	Terlibat pada perbaikan DNA dan aktivasi transkripsi	Payudara Ovarium
CDKN2A/p16	Menghambat <i>cyclin-dependent kinase</i>	GIT Kepala dan leher NHL Paru-paru
E-cadherin	Meningkatkan proliferasi, invasi dan metastasis	Payudara Tiroid Lambung
hMLH1	Defek perbaikan DNA dan mutasi gen	Usus besar Lambung Endometrium Ovarium
MGMT	Berhubungan p53 pada perbaikan DNA	Kepala dan leher Paru-paru Otak
p15	<i>Unrestrained entry of cells into activation and proliferation</i>	Leukimia Lymphoma SCC, paru-paru
Rb	Kegagalan untuk menekan transkripsi seluler gen yang dibutuhkan untuk replikasi DNA dan pembagian sel	Retinoblastoma Oligodendroglioma

2.3.7 Hipometilasi

Hipometilasi pada kanker pertama kali ditemukan awal 1980 oleh Melanie Ehrlich, Ph.D. Pada kanker selalu ditemukan tingkat global metilasi DNA yang rendah, bila dibandingkan dengan banyak metilasi yang ditemukan di jaringan normal manusia. Efek satu hipometilasi adalah peningkatan instabilitas kariotipik. Hipometilasi global bukanlah pertanda universal kanker, bagaimanapun beberapa tumor menunjukkan demetilasi global dan sebagian lainnya tidak (Volkers N, 2000).

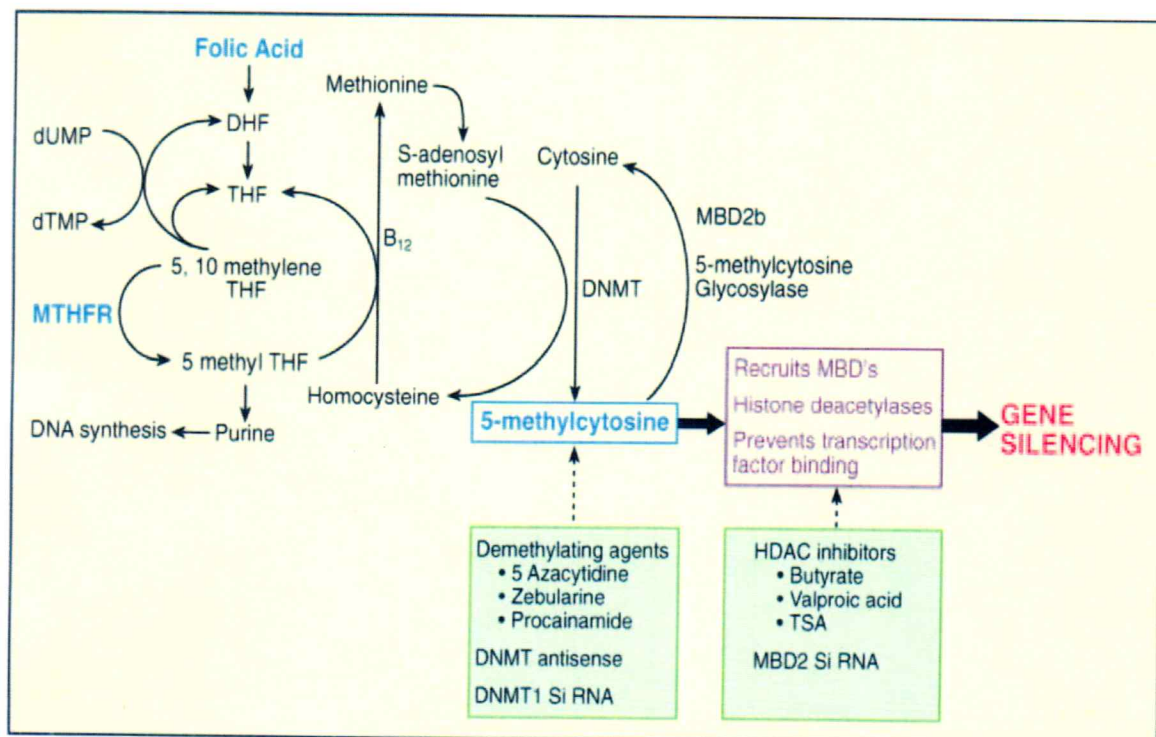
Hipometilasi adalah tipe kedua defek metilasi yang diteliti pada berbagai macam keganasan. Metilasi global gen ini sering terdapat pada beberapa kanker, seperti kanker payudara, servikal, dan otak, yang menunjukkan peningkatan progresifitas (derajat keganasan). Hipometilasi pada DNA menyebabkan aktivasi transkripsional dan ditemukan pada berbagai tipe kanker seperti kanker kandung kemih. Hipometilasi juga mengakibatkan gangguan ekspresi pada gen yang bersangkutan (Das P M & Singal R, 2004).

Mekanisme yang sering berkaitan secara nonspesifik atau *global* pada hipometilasi DNA yaitu transformasi keganasan seperti instabilitas genom, keabnormalan struktur kromatin, dan aktivasi *onkogen* yang mungkin dapat terjadi secara biologi (Piyathilake *et al*, 2005).

2.4 Karsinogenesis Karsinoma Sel Skuamous Rongga Mulut

Peran nutrisi di dalam mempengaruhi ekspresi gen dengan gen polimorfik dan modulasi metilasi DNA telah mendapat perhatian sekarang ini. Gangguan keseimbangan *vitamin-dependent* dan metabolisme *one-carbon* (grup metil) dapat mempengaruhi resiko penyakit hati, defek pada batang syaraf, dan kanker. Gangguan tersebut dapat terjadi karena defisiensi 2 mikronutrisi *essential* pada metabolisme tersebut, yaitu folat dan cobalamin (vitamin B12) (Ulrich C M, 2008).

Metabolisme grup metil terbagi menjadi dua cabang: cabang pertama terdiri dari reaksi yang meliputi sintesis purin dan timin dan cabang kedua meliputi sintesis *methionin* dan *S-adenosil methionin* untuk sintesis protein dan poliamin dan reaksi metilasi. Enzim yang membawa grup metil dari cabang pertama ke cabang kedua yaitu *metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR)*. *MTHFR* secara irreversibel merubah *5,10-metilentetrahidrofolat* menjadi *5-metil THF*, yang akan mendonor grup metil dalam proses pembentukan *methionin* oleh *homocystein* (lihat gambar 2.9) (Das P M & Singal R, 2004).



Gambar 2.9 Regulasi asam folat, metilasi cytosin, dan *gen silencing*
(Das P M & Singal R, 2004).

Keterangan: *dUMP*, deoxyuridine monophosphate; *dTMP*, deoxythymidine monophosphate; *DHF*, dihydrofolate; *THF*, tetrahydrofolate; *MTHFR*, methylenetetrahydrofolate reductase; *DNMT*, DNA methyltransferase; *MBD*, methyl CpG binding domain; *TSA*, trichostatin A.

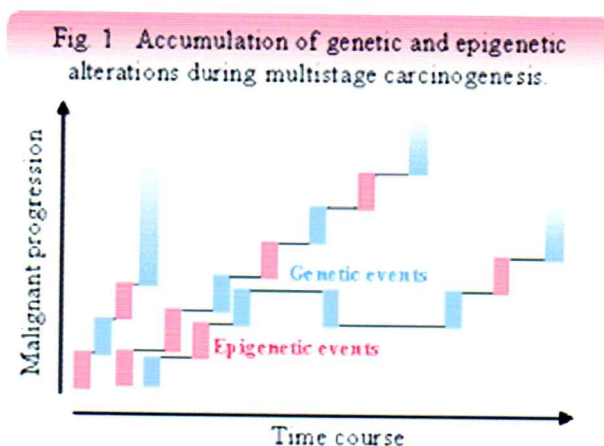
Individu dengan penurunan aktifitas *MTHFR* yang dikarenakan mutasi, mempunyai jumlah *homocystein* yang berlebihan pada darah dan urine serta peningkatan gangguan mental dan penyakit vaskuler. Terdapat dua perbedaan penurunan fungsi polimorfik varian *MTHFR* : *MTHFR* C677T dan *MTHFR* A1298C. C677T dihubungkan dengan kadar *homocystein* yang tinggi dalam serum dan juga dihubungkan dengan resiko penyakit vaskuler dan defek pada batang syaraf (Bailey L B & Gregory J F, 1999). Polimorfik ini berhubungan

dengan peningkatan resiko kanker seperti kanker endometrial, kanker payudara, kanker ovarium, kanker esofagus, dan kanker lambung. Resiko kanker dihubungkan dengan *MTHFR* polimorfik yang dimodulasi oleh asupan folat. Apabila asupan folat kurang, maka metilasi dan sintesis DNA akan terganggu sehingga meningkatkan resiko kejadian kanker. Defisiensi folat akan mengakibatkan hipometilasi dan hipermetilasi pada gen spesifik, hal ini ditunjukkan pada penelitian hewan yang menunjukkan hipometilasi gen p53 dan peningkatan aktifitas DNA metiltransferase (Das P M & Singal R, 2004).

2.5 Implikasi Metilasi DNA

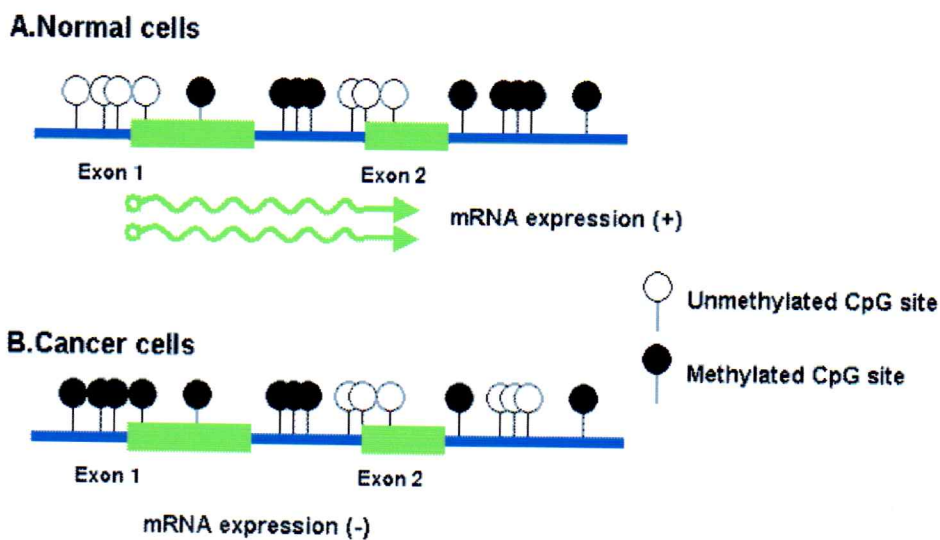
Karsinogenesis terdiri 3 tahap yaitu *initiation*, *promotion* dan *progression*, hal ini merupakan kerangka konseptual yang digunakan untuk memahami masalah kanker. Pada tahap inisiasi terjadi perubahan gen yang memfasilitasi klonal ekspansi sel dalam respon untuk merangsang promosi dan biasanya mutagenesis yang berperan. Bagaimanapun peristiwa epigenetik juga dapat berperan dalam tahap inisiasi. Meskipun fakta menunjukkan bahwa banyak inisiator karsinogenesis memiliki kemampuan mutagen, namun tidak semua perubahan biologi tersebut berasal dari proses mutagenesis. Hipermetilasi yang dapat menghambat *tumor supresor gen* dan hipometilasi yang mendukung peningkatan penyimpangan dari ekspresi *onkogen* merupakan dua hal yang mungkin terjadi dalam tahap inisiasi karsinogenesis (Goodman J I, 2000).

Perubahan genetik menyebabkan aktivasi *onkogen* dan inaktivasi *tumor supresor gen* telah diakui sebagai dasar molekuler yang dapat berperan dalam tahapan karsinogenesis. Bagaimanapun, kejadian genetik tidak sendirian untuk dapat menyebabkan berbagai macam gambaran histologi yang tercermin dalam kompleksitas dari karakter biologi tumor. Saat ini telah difokuskan pada kejadian epigenetik seperti perubahan metilasi DNA, yang bersifat reversibel dan mampu menjelaskan dari keanekaragaman gambaran yang ada (National Cancer Center, 2008). Metilasi ini merupakan faktor kedua yang berperan terhadap tahapan karsinogenesis disamping mutasi sebagai faktor pertama yang telah lama diketahui (lihat gambar 2.10) (Goodman J I & Watson R E, 2002).



Gambar 2.10 Akumulasi perubahan genetik dan epigenetik dalam tahapan karsinogenesis (National Cancer Center, 2008).

Regulasi epigenetik ekspresi gen berdasar pada modulasi ekspresi gen seperti pada metilasi DNA, 5-metilcytosin pada DNA. Berbeda dengan mutasi, ini terkait dengan ekspresi gen yang tidak berdasar perubahan pada rangkaian DNA. Perubahan metilasi DNA berperan penting dalam ekspresi gen dengan cara mempengaruhi kemampuan *DNA-binding protein* yang berinteraksi dengan elemen *cis*, akhirnya terjadi perubahan krusial dari ekspresi gen terkait dengan karsinogenesis (lihat gambar 2.11) (Goodman J I, 2000).

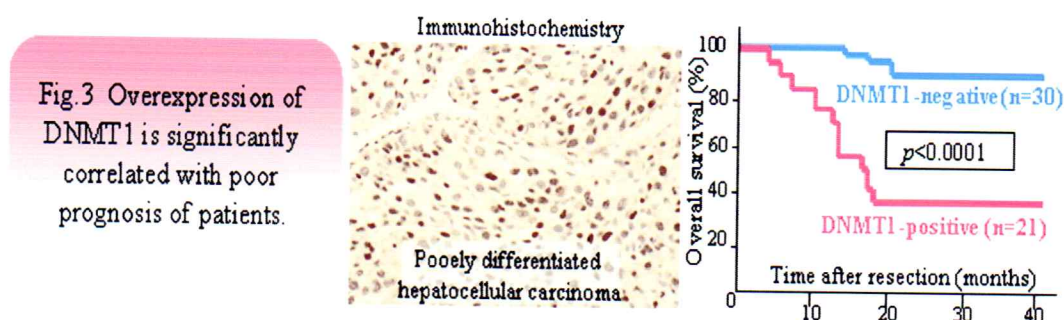


Gambar 2.11 Ekspresi mRNA pada sel normal dan sel kanker (National Cancer Center, 2008).

Grup *CpG* yang tidak termetilasi dalam klaster yang disebut "*CpG island*" yang mana memberikan daerah regulasi 5' di beberapa gen. Pada proses penyakit seperti kanker, *gen promoter CpG* mengalami abnormal hipermetilasi, yang berperan terhadap *transcriptional silencing*. Metilasi DNA mempengaruhi transkripsi gen melalui dua cara yaitu pertama, metilasi DNA secara fisik mengganggu protein transkripsi binding dan kedua yaitu melalui protein yang

dikenal *methyl-CpG-binding domain proteins (MBDs)*. Protein dari *MBD* menarik penambahan protein ke lokus, contoh protein *remodeling khromatin* menstimuli terjadinya deasetilase histon sehingga dapat memodifikasi histon, dengan cara demikian maka akan tersusun rapat sehingga menginaktivasi kromatin. *Methyl-CpG-binding protein 2 (MBD2)* bertindak dalam *transcriptional silencing* hipermetilasi gen pada kanker (Wikipedia, 2008).

Berdasarkan Penelitian National Cancer Center di Jepang tahun 2008 melaporkan bahwa terdapat hubungan antara aktifitas DNMT1 dengan prognosis kanker yang buruk. Overekspresi DNMT1 merupakan DNA metiltransferase mayor yang signifikan berhubungan dengan akumulasi metilasi DNA pada gen terkait tumor, Metilasi *CpG island* merupakan pertanda fenotip kanker, tingkat keagresifan kanker dan *poor prognosis* (lihat gambar 2.12) (National Cancer Center, 2008).



Gambar 2.12 Overekspresi DNMT1 terkait dengan *poor prognosis* penderita (National Cancer Center, 2008).

Metilasi DNA juga merupakan mekanisme alternatif bagi terjadinya mutasi atau delesi dalam gangguan fungsi yang terjadi pada *tumor supresor gen*. Penyimpangan metilasi yang secara normal tidak terjadi pada daerah *un-metilasi CpG island* telah dilaporkan sebagai kejadian relatif pada kematian dan

transformasi sel serta berhubungan dengan inkativasi transkripsional *tumor supresor gen* pada kanker (Kato, Keizo *et al*, 2006).

2.6 Gen yang Mengalami Metilasi DNA

Penyimpangan metilasi DNA merupakan molekuler lesi yang biasa terjadi pada sel kanker. Tidak seperti mutasi gen (perubahan nukleotida, delesi, dan rekombinan) dan bukan pula keabnormalan sitogenetik pada tumor manusia yang sebiasa perubahan metilasi DNA. Banyak peneliti mengungkapkan bahwa metilasi DNA pada kanker adalah hambatan (*silencing*) *tumor supresor gen* oleh hipermetilasi (peningkatan metilasi) pada daerah promotor *CpG island* (Esteller M, 2005).

Perubahan beberapa gen berkaitan dengan perkembangan *Oral squamous Cell Carcinoma*. Delesi dan mutasi pada kromosom 9p21 telah dilaporkan terjadi di *OSCC*. Hambatan epigenetik dari ekspresi gen oleh hipermetilasi promotor *CpG island* telah menunjukkan peran penting dalam pembentukan berbagai kanker termasuk *OSCC* (Baylin and Herman, 2000). Promotor hipermetilasi pada beberapa gen pertumbuhan terkait dalam perkembangan kanker, dalam hal ini *tumor supresor gen* yaitu p16 INK4a (p16) dan *O₆-metilguanin-DNA metiltransferase (MGMT)* (Esteller, 2000b). Perubahan epigenetik selalu dihubungkan dengan kehilangan ekspresi gen dan keadaan ini penting bagi berbagai kejadian genetik yang dibutuhkan untuk mengendalikan progresi tumor (Baylin and Herman, 2000).

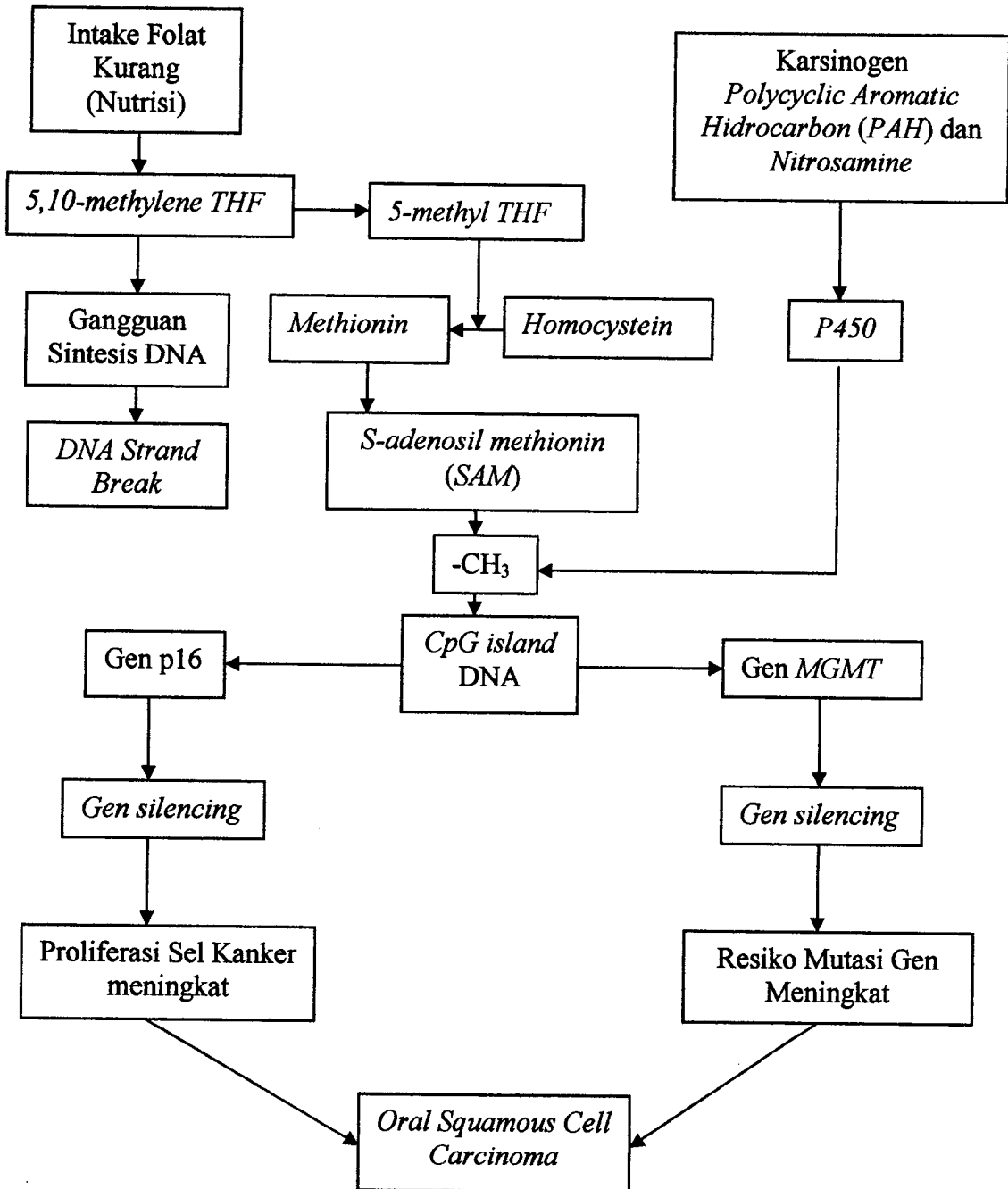
Hipermetilasi pada gen spesifik (p16) telah dilaporkan pada epitel displasia rongga mulut (Piyathilake C J, 2005). Gen p16 merupakan salah satu gen target di dalam proses karsinogenesis, dan menonaktifkan gen ini telah sering ditunjukkan pada berbagai tumor. Gen 16 tercetak pada kromosom area 9p21 yang dikenal menyandikan inhibitor *cyclin-dependent kinase (CDK) 4/ cyclin D kompleks*, yang mengatur fosforilasi protein retinoblastoma (pRb) dan kontrol progresi siklus sel pada G1/S. Demikian, proliferasi sel diregulasi oleh produk protein gen p16. Ini berarti kehilangan protein p16 menyebabkan kehilangan kapasitas untuk menginaktivasi *CDK* sehingga mengakibatkan ketidakmampuan sel untuk mengaktifasi pRb. Demikian peran penting dalam tahapan karsinogenesis pada kanker esofagus, lambung, dan kolon-rektal karsinoma (Kato, Keizo *et al*, 2006).

*O*₆-metilguanin DNA metiltransferase (*MGMT*) merupakan enzim perbaikan DNA yang melindungi sel dari karsinogenesis yang dipengaruhi *alkylating agent* dengan memutus perlekatan dari posisi *O*₆ guanin (Esteller M *et al*, 1999). Dengan kegagalan dalam memperbaiki DNA maka akan berperan penting terhadap kejadian transisi mutasi pada gen seperti *K-ras*. Mekanisme dominan dari inaktivasi gen *MGMT* ini dihubungkan dengan kehadiran grup metil pada *CpG* yang menyebabkan hambatan atau inaktivasi transkripsi gen. *MGMT* sering terinaktivasi pada lymphoma dan kanker kolon, paru-paru, dan juga tumor otak (Esteller M *et al*, 2000a).

BAB 3
KERANGKA KONSEP

BAB 3

KERANGKA KONSEP



Asupan folat yang kurang akan menyebabkan *5,10-methylene tetrahydrofolat (THF)* berkurang. Secara normal ketersediaan *5,10-methylene THF* dipergunakan untuk sintesis DNA. Apabila *5,10-methylene THF* berkurang maka akan menyebabkan gangguan pada sintesis DNA sehingga terjadi *DNA strand break*. Pada kondisi defisiensi folat *5,10-methylene THF* akan lebih banyak diubah bentuk menjadi *5-metil THF* yang dibutuhkan untuk pembentukan *S-adenosil methionin*.

S-adenosil methionin merupakan koenzim yang terlibat pada transfer grup metil (-CH₃) pada DNA. *S-adenosil methionin* berperan sebagai donor dan *CpG island* sebagai aseptor. Selain itu, paparan rokok dan alkohol yang secara langsung dan terus menerus pada mukosa, diduga menjadi etiologi lokal untuk kejadian reaksi metilasi DNA. Bahan karsinogen yaitu *polycyclic aromatic hydrocarbon* dan *nitrosamine* yang terdapat di rokok juga diduga berperan dalam kejadian metilasi, dimana bahan karsinogen tersebut akan dimetabolisme oleh *P450* menjadi metabolit yang aktif dan bersifat elektrofilik sehingga mampu menyerang *CpG island* yang bersifat nukleofilik. Reaksi penambahan grup metil yang berikatan pada DNA dikatalisasi oleh DNA Metiltransferase. Grup metil yang ditransfer akan berikatan pada karbon 5' posisi cincin cytosine (5'CG 3') *CpG island* yang menghasilkan 5-metilcytosin. 5-metilcytosin akan mengakibatkan inaktivasi gen melalui hambatan faktor transkripsi, pembentukan *Methyl Binding Domain Proteins*, dan deasetilase histon. Pada karsinogenesis *OSCC* gen spesifik yang mengalami metilasi merupakan *tumor supresor gen* yaitu p16 dan *MGMT*. Peristiwa metilasi akan menginkativasi gen-gen tersebut sehingga gen kehilangan ekspresi.

Produk protein yang dihasilkan gen p16 berfungsi untuk mengontrol progresifitas siklus sel pada fase G1/S sehingga kehilangan ekspresi gen p16 dapat menyebabkan proliferasi sel kanker meningkat. *MGMT* berfungsi untuk memutuskan ikatan agen alkyl pada *O₆-guanin* yang mencegah agar DNA tidak mengalami transisi mutasi gen. Kehilangan ekspresi *MGMT* akan mengakibatkan perbaikan DNA terganggu sehingga dapat meningkatkan resiko kejadian transisi mutasi gen. Kehilangan ekspresi dari gen p16 dan *MGMT* inilah yang berperan dalam karsinogenesis karsinoma sel skuamous rongga mulut.

BAB 4
PEMBAHASAN

BAB 4

PEMBAHASAN

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) merupakan neoplasma yang sering ditemukan pada daerah kepala dan leher dan dapat menimbulkan morbiditas (Sanzhez Cespedes *et al*, 2000) dan mortalitas (Yakushiji T *et al*, 2001). Delesi dan mutasi pada p53 sering dilaporkan pada *OSCC* (Tokugawa *et al*, 2002). Selain itu, hambatan ekspresi gen akibat peristiwa epigenetik hipermetilasi pada *CpG island* dilaporkan juga berperan dalam karsinogenesis *OSCC* (Baylin dan Herman, 2002). Pendeteksian perubahan molekuler pada keadaan lesi prekanker dan kanker serta pengetahuan tentang tumorigenesis *OSCC* merupakan hal penting untuk memperkirakan prognosis dan menentukan rencana perawatan.

Perubahan keseluruhan kadar dan pola metilasi pada beberapa gen merupakan perbedaan karakteristik sel kanker. Menurut Sulewska *et al*, 2007, hasil penelitian telah menunjukkan bahwa hipometilasi dan hipermetilasi DNA berhubungan dengan sel kanker. Pengaruh metilasi DNA pada karsinogenesis dapat melalui beberapa mekanisme yaitu hipometilasi DNA, dan hipermetilasi *tumor supresor gen* yang secara normal tidak mengalami metilasi pada *CpG island*.

Metilasi DNA merupakan penambahan kovalen grup metil ($-CH_3$) pada 5' karbon cincin pirimidin deoksicytidin yang menghasilkan 5-deoksicytidin. Reaksi ini dikatalisasi oleh DNA methyltransferase yang memiliki substrat sekuen DNA 5'-CG-3' dan juga berhubungan dengan *CpG* dinukleotida (Caiifa, 2005).

Ikatan grup metil yang terjadi merupakan ikatan kovalen terkoordinasi di mana ikatan yang terbentuk diakibatkan oleh sumbangan sepasang elektron dari salah satu atom. Berdasarkan pada reaksi metilasi DNA tampak bahwa *CpG* memiliki kandungan elektron yang tinggi sehingga bersifat nukleofilik, dalam hal ini akan mendonorkan elektron pada saat berikatan dengan grup metil. Dengan demikian terbentuk produk baru yaitu 5-metilcytosin.

CpG island sebagian besar di akhir gene 5' (daerah promotor) dan banyak mengandung *transcription factors binding sites*. Sulewska A *et al*, 2007 membagi tipe promotor menjadi 2 yaitu yang banyak mengandung *CpG island* dan sedikit *CpG island*. Sekitar setengah dari semua gen manusia mengandung *CpG island*, dan menurut Issa JP, 2000, Hal ini diduga bahwa *CpG island* berfungsi sebagai *housekeeping genes* dan terdapat di beberapa jaringan gen spesifik seperti *tumor supresor gen*.

Daerah promotor *CpG island* secara umum tidak mengalami metilasi di jaringan normal (Herman JG, 2003). *CpG island* yang tidak mengalami metilasi ditemukan pada organisme muda yang mengalami demetilasi yang kemudian akan mengalami metilasi sebagai akibat dari umur organisme (*age-dependent methylation*) dan merupakan tahap awal kanker yang berhubungan dengan transformasi sel.

Enzim yang mentransfer grup metil pada cincin cytosine yaitu famili DNA metiltransferase yang terdiri DNMT1, DNMT3A, DNMT3B dan DNMT3L (Klose RJ, 2006). Protein tersebut dapat ditemukan di nukleolus dan nukleoplasma. DNMT1 yang berfungsi untuk mengkatalisis reaksi metilasi yaitu sekitar 97 % - 99,9 % selama mitosis, dan DNMT3A dan DNMT3B menyalurkan

metilasi sekitar 3 % - 5 % pada sintesis DNA (*de novo* metilasi) (Jaenisch R, 2003, Richardson B, 2003). Mekanisme aktifitas DNMT1 telah diketahui dengan baik. Pada fase S siklus sel, protein ini mencapai konsentrasi maksimum dan membentuk kompleks dengan antigen nuklear proliferasi sel (PCNA). PCNA mengelilingi DNA seperti cincin dan memberikan pergerakan bagi metiltransferase untuk menjalankan fungsi sebagai katalis. DNMT1 berfungsi untuk menggerakkan grup metil dari *S-adenosil methionin* (SAM) menuju lokasi cytidin yang tidak mengalami metilasi. Hasil dari proses ini didapatkan metilasi yang simetri pada partikel DNA

DNMT3A dan DNMT3B berfungsi pada tahap awal perkembangan embrio dimana metilasi yang dihasilkan untuk kepentingan diferensiasi sel dan jaringan. Peran dari *de novo* metiltransferase pada sel masih belum dapat dijelaskan secara tuntas (Kim SH *et al*, 2007). Namun DNMT3B ditemukan aktif pada beberapa sel kanker seperti DNMT3B2 pada kanker payudara, DNMT3B3 pada kanker kandung kemih, dan DNMT3B4 pada karsinoma hepatoseluler (Luczak MW, 2006). Protein DNMT3L berfungsi secara tidak langsung dalam proses metilasi DNA (Chen ZX *et al*, 2005). DNMT3L sendiri tidak memiliki aktifitas katalis, namun apabila bekerja dengan *de novo* metiltransferase dapat memberikan rangsangan untuk aktifitas katalis dan meningkatkan afinitas DNA.

Pengaruh metilasi DNA terhadap ekspresi gen telah diteliti oleh berbagai peneliti pada beberapa tahun belakangan ini. Pada awalnya, peneliti menunjukkan adanya hubungan antara tempat spesifik cytidin yang mengalami metilasi dengan hambatan transkripsi DNA. Hal ini telah terbukti bahwa metilasi *CpG island* daerah promotor selalu ditemukan berhubungan dengan kehilangan ekspresi gen

tanpa menyebabkan perubahan rangkaian dasar DNA (Luczak MW, 2006). Metilasi DNA dikelompokkan sebagai mekanisme epigenetik. Beberapa mekanisme supresi gen oleh metilasi juga telah dilaporkan. Modifikasi cytidin menjadi 5-metilcytidin telah diakui menghambat faktor spesifik transkripsi dan menonaktifkan ekspresi gen. Faktor transkripsi yang sensitif, antara lain *AP-2*, *cMyc/Myn*, *CREB*, *E2F*, *NF κ B*. Faktor lainnya yaitu *SP1*, *CTF*. Faktor transkripsi juga diaktivasi oleh protein yang menstimulasi kondensasi khromatin. 5-metilcytosin akan menarik protein yang disebut *proteins binding methylated cytosine*. Perubahan dari struktur khromatin disebabkan oleh *proteins binding methylated cytosine* antara lain *MeCP-1*, *MeCP-2*, *MBD1*, *MBD2*, *MBD3*, *MBD4* (Sekiya T, 2002; Wilson AS, 2007).

Struktur protein *MeCP-2* dilaporkan berperan pada dua mekanisme regulasi gen yaitu metilasi DNA dan deasetilase histon. Pada beberapa kasus telah dibuktikan dan dilaporkan bahwa metilasi DNA lebih mendominasi deasetilase histon (Arney KL, 2004). Pengaruh *MeCP-2* yaitu berpartisipasi pada formasi *double strand* DNA agar lebih stabil, menginaktifkan struktur khromatin, tetapi juga dapat menghambat transkripsi DNA. Selain itu, diduga *MBD1*, *MBD2*, *MBD3* juga berperan dalam interaksi deasetilase histon pada *H3* sehingga terjadi perubahan struktur kromatin dan inaktivasi transkripsi gen.

Menurut Zhang J *et al*, 2002, hasil penelitian menunjukkan bahwa hipermetilasi gen p16 ditemukan lebih banyak pada tahap kanker lanjut dan sedikit pada tahap kanker dini pada penderita kanker paru-paru. Oleh karena DNA metilasi yang memiliki hubungan terhadap karsinogenesis *OSCC* maka hal ini menarik untuk diketahui keberadaan atau ketidakberadaan metilasi terhadap

perkembangan kanker. Saat ini, berbagai penelitian menunjukkan metilasi terkait dengan prognosis kanker. Hal ini akan membantu dalam pemilihan perawatan awal kanker, memonitor kondisi penderita terhadap terapi kanker, dan memperkirakan *survival times* penderita. Pengetahuan tentang profil metilasi juga akan membantu dalam memperkirakan respon penderita terhadap kemoterapi. Penelitian menurut Esteller M *et al*, 2000b, menunjukkan bahwa metilasi juga ditemukan pada gen perbaikan DNA (*MGMT*) sehingga dapat meningkatkan sensitivitas terhadap *alkylating agents* yang memicu kejadian mutasi gen.

Hipermetilasi DNA dikenal sebagai mekanisme selain mutasi atau delesi dalam mengganggu fungsi *tumor supresor gen* (Chan *et al*, 2002). Hipermetilasi ini dihubungkan dengan perkembangan kanker yang telah diteliti pada beberapa *tumor supresor gen* yaitu p16 dan *O₆-metilguanin DNA metiltransferase (MGMT)* (Esteller, 2000b). Pada pasien *OSCC*, ditemukan tingkat hipermetilasi yang tinggi pada p16 dan gen perbaikan DNA (*MGMT*) (Shintani *et al*, 2001). Keberadaan epigenetik hipermetilasi pada gen spesifik dibutuhkan dalam mendiagnosa sel tumor pada pasien yang beresiko *OSCC*. Perubahan epigenetik ini selalu dihubungkan dengan kehilangan ekspresi gen dan dapat meningkatkan kecenderungan untuk terjadi peristiwa genetik. Perubahan metilasi DNA dapat mengakibatkan instabilitas gen dan terkait dengan kejadian tahap permulaan dan tahap prekanker. Pada penderita kanker, penyimpangan DNA metilasi secara signifikan berhubungan dengan keagresifan dan prognosis yang jelek. Selanjutnya, beberapa peneliti mempertimbangkan bahwa kondisi prekanker menunjukkan perubahan metilasi DNA dapat meningkatkan menuju ke tahap keganasan kanker.

p16 merupakan target mayor dalam karsinogenesis dan inaktivasi p16 telah banyak dilaporkan pada beberapa tipe tumor (Sato N *et al*, 2002). p16 terletak pada kromosom 9p21 yang dikenal untuk menyandi inhibitor *CDK 4/cyclin D complex* dimana berfungsi untuk mengontrol progresi siklus sel pada fase G1/S (Kato K *et al*, 2006). Proliferasi sel diregulasi oleh produk protein yang dihasilkan gen p16, hal ini berarti apabila kehilangan ekspresi gen p16 akan menyebabkan kehilangan kapasitas untuk menginaktivasi *CDK4* sehingga proliferasi sel kanker meningkat.

MGMT merupakan enzim perbaikan DNA yang melindungi DNA dari agen alkyl dengan memutuskan perlekatan pada posisi O₆ guanin. Kegagalan untuk memperbaiki DNA dapat memicu transisi mutasi pada gen seperti *K-ras*. Menurut Kato K *et al*, 2006, mekanisme dominan pada inaktivasi gen *MGMT* yaitu peristiwa metilasi pada *CpG island* yang menyebabkan hambatan transkripsi, maka inaktivasi gen *MGMT* akan meningkatkan resiko kejadian mutasi.

Meskipun secara normal *CpG island* terlindungi dari metilasi DNA, namun telah dilaporkan metilasi DNA terjadi pada karsinogenesis dan proses menua (Issa, 2000). Kejadian ini mendorong para peneliti untuk memeriksa status p16 dan *MGMT* pada jaringan mukosa normal rongga mulut. Deteksi keberadaan metilasi dengan menggunakan Metilasi Spesifik PCR (MSP) gen p16 dan gen *MGMT* pada mukosa rongga mulut non-kanker dapat memprediksi kemungkinan *OSCC* dan dari hasil penelitian telah dilaporkan bahwa pada jaringan mukosa normal pada pasien dengan resiko *OSCC* didapatkan metilasi (Kato K *et al*, 2006). Pada perokok maka mukosa rongga mulut akan terpapar rokok yang banyak mengandung bahan karsinogen (*polycyclic aromatic hidrocarbon* dan

nitrosamine), alkohol secara langsung dan terus-menerus, selain itu rongga mulut juga sangat mudah terluka akibat rangsangan seperti iritasi *denture* ataupun karies, hal tersebut diduga sebagai etiologi yang juga menyebabkan metilasi pada mukosa normal.

Das P M dan Singal R, 2004, melaporkan ada hubungan antara regulasi asam folat, gen polimorfik, reaksi metilasi DNA dan kanker. Hal tersebut terkait dengan metabolisme *one carbon* dimana terdiri dari 2 cabang yaitu pertama sintesis purin dan timin, kedua sintesis *methionin* dan *SAM*. Kedua cabang tersebut dihubungkan dengan reduktase metilentetrahidrofolat (*MTHFR*) yang mentransfer grup metil dari cabang pertama ke cabang kedua untuk pembentukan *methionin*. Aktifitas *MTHFR* ini dimodulasi oleh asupan asam folat, apabila asupan asam folat cukup maka metabolisme akan berjalan dengan baik sedangkan apabila asupan asam folat kurang maka dapat mengakibatkan penyakit vaskuler, defek pada batang saraf, gangguan sintesis DNA dan reaksi metilasi (hipermetilasi dan hipometilasi). Reaksi metilasi ini yang mengakibatkan resiko kejadian kanker.

Telah diketahui reaksi metilasi yaitu reaksi penambahan grup metil pada 5' cytosine sehingga menghasilkan 5-metilcytosin. Reaksi ini dapat diperbaiki akibat terdapat agen demetilasi DNA. Agen demetilasi, antara lain *5-azacytidine*, *zebularine*, dan *procainamide*. Selain itu, terdapat *DNMT antisense* dan *DNMT1 Si RNA* yang juga membuat reaksi metilasi ini dapat diperbaiki. Demetilasi DNA yang bersifat pasif terjadi dimana aktifitas *DNMT* dihambat ataupun kadar *DNMT* dalam konsentrasi rendah. Sedangkan proses demetilasi yang bersifat aktif terjadi karena aktifitas *5-metilcytosin DNA glycosylase*

(5-MCDG) yang memperbaiki 5-metilcytosin menjadi cytosine kembali (Shames DS *et al*, 2006; Richardson B, 2003).

Reaksi metilasi dapat menyebabkan kehilangan ekspresi gen melalui beberapa proses yaitu membentuk *MBD*, deasetilase histon, dan mencegah faktor transkripsi. Adapun agen yang dapat mencegah proses tersebut yaitu inhibitor *HDAC* (*Butirate*, *Valproic Acid*, dan *Trichostatin A*) dan *MBD2 Si RNA* (Das P M & Singal R, 2004). Penelitian dengan menggunakan kultur sel menunjukkan bahwa obat-obat demetilasi dapat mengembalikan fungsi gen akibat dari metilasi (Plumb JA *et al*, 2000). Tidak seperti modifikasi genetik, perubahan epigenetik bersifat reversibel, dengan demikian metilasi dapat dijadikan sebagai target terapi di tingkat biologi molekuler. Hal tersebut sangat potensial untuk mengembalikan fungsi ekspresi gen dari DNA yang mengalami metilasi sehingga dapat memberikan pilihan perawatan klinik pada penderita kanker.

Beberapa percobaan klinik oleh Strathdee, 2002, yaitu penggunaan azacytidine, histone deasetilasi inhibitor dan fenilbutirat dilaporkan dapat mengembalikan gen yang kehilangan ekspresi pada tumor. Obat-obatan yang biasa digunakan untuk target metilasi adalah *azacytidin* (*5-azacytidin*), *decitabine* (*5-aza-2-deoksicytidin*), *fazarabine* (*1-D-arabinofurasonyl-5-azacytosin*) dan *dihidro-5-azacytidine* (Goffin J & Eisenhauer E, 2002). Semua obat tersebut merupakan derivat dari deoksicytidin dengan beberapa modifikasi pada posisi 5' pada cincin pirimidin. Obat lain adalah *zebularine* dan *antisense oligodeoksinukleotida* (Cheng JC, 2003). *Histone deasetilase (HDAC)* inhibitor juga menjadi pilihan yang potensial sebagai agen terapi (Thiagalingam S *et al*,

2003). Diantara agen-agen demetilasi yang potensial berguna adalah *antisense DNMT1* dan *Si RNA* (Das P M & Singal R, 2004).

Penelitian Robert *et al*, 2003, menunjukkan bahwa metode terapi dengan menggunakan *5-aza-2-deoksicytidin* memberikan efek hambatan pada DNMT1 dan tidak pada DNMT3A atau DNMT3B. Oleh karena metilasi DNA menekan ekspresi gen pada bagian deasetilase histon, inhibitor *HDAC* dapat digunakan untuk mengaktifasi ekspresi dari gen yang mengalami metilasi. Meskipun inhibitor *HDAC* gagal untuk mengaktifasi ekspresi gen yang mengalami metilasi bila digunakan secara tunggal, tetapi agen ini dapat memberikan efek sinergi dengan agen demetilasi lain untuk merangsang ekspresi gen yang mengalami metilasi (Cameron EE *et al*, 1999). Penelitian oleh Segura *et al*, 2003, yaitu pada kanker payudara dengan menggunakan kombinasi *hidralazine* dan *procainamide* menunjukkan rangsangan demetilasi dan menyebabkan reekspresi p16 pada kultur sel, sehingga berguna sebagai agen antikanker. Percobaan klinis dengan menggunakan kombinasi agen demetilasi dan inhibitor *HDAC* pada kanker sekarang mulai dikembangkan. Bagaimanapun kombinasi antara diasetilasi histon dan agen terapi konvensional masih perlu dikaji lebih lanjut dengan menggunakan penelitian laboratoris dan percobaan klinis.

Namun perlu diperhatikan mengenai penggunaan obat demetilasi secara luas karena dapat memberikan efek samping yang serius dan merangsang transformasi maligna dari gen. Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa penggunaan inhibitor metil transferase dapat menyebabkan metastasis kanker prostate melalui invasi dan rangsangan gen (Sato N *et al*, 2003). Pendekatan terapi melalui strategi kombinasi untuk terapi kanker telah dijadikan fokus perhatian

bagi para klinisi dan hal ini berjalan dengan sukses. Kombinasi dapat memberikan efek pengurangan dosis obat dan mengurangi efek samping pada penderita kanker. Bagaimanapun yang harus diperhatikan adalah bagaimana mengkombinasikan agen-agen tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar memberikan hasil terukur. Apabila pengetahuan tentang profil metilasi dan obat terapi gen spesifik diketahui secara pasti dan menyeluruh maka perawatan penderita kanker akan lebih fokus dan rasional.

Hubungan antara peristiwa hipermetilasi pada *tumor supresor gen* pada sekuen promotor dan peran pada tahapan karsinogenesis menjadi perhatian beberapa tahun terakhir ini seperti penemuan penurunan aktifitas demetilasi DNA yang signifikan pada sel tumor. Pengetahuan tentang penyebab dan pengaruh metilasi DNA terus dikembangkan demikian juga dengan penemuan metode cepat untuk mendeteksi sekuen yang mengalami metilasi ataupun yang tidak mengalami metilasi. Penelitian terbaru dengan menggunakan teknik *Real-Time PCR* untuk pemeriksaan metilasi dan analisis metilasi dapat digunakan untuk menegakkan diagnosa dini penyakit kanker (Shivapurkar *et al*, 2007). Di masa depan, pengetahuan tentang perubahan epigenetik pada gen manusia yang berhubungan dengan tahapan karsinogenesis dapat memfasilitasi diagnosa dini dan pengenalan baru pada masyarakat serta menjadi metode perawatan efisien pada kanker. Penyimpangan hipermetilasi gen juga sering didapatkan pada *OSSC*. Pada penderita *OSSC*, didapatkan kadar yang tinggi dari hipermetilasi promotor pada gen p16 dan gen DNA repair yaitu *MGMT* yang telah dikenali. Keberadaan epigenetik hipermetilasi promotor nantinya akan sangat berguna untuk target molekuler dalam identifikasi sel tumor pada penderita dengan predisposisi *OSSC*.

BAB 5
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Reaksi metilasi menyebabkan hambatan transkripsi gen sehingga gen spesifik akan kehilangan ekspresi.
2. Pada *OSCC* hipermetilasi ditemukan pada *tumor supresor gen* yaitu *p16* dan *MGMT*. Pada mukosa normal penderita dengan predisposisi *OSCC* ditemukan hipermetilasi pada kedua gen tersebut.
3. Metilasi DNA dapat dijadikan target perawatan kanker yang intensif ditingkat molekuler.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang metilasi pada gen-gen spesifik pada kanker sehingga dapat membantu untuk menegakkan diagnosa dini *oral squamous cell carcinoma*.
2. Perlu penelitian pada saliva untuk mencari *diagnostic marker* sebagai upaya deteksi kanker di rongga mulut.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Arney KL, Fisher AG. 2004. *Epigenetic aspects of differentiation*. J Celi Sci Vol. 117. p. 4355-4363.
- Bailey LB, Gregory JF. 1999. *Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: Metabolic significance, risks and impact on folate requirement*. J Nutr Vol. 129. p. 919-922.
- Baylin, S. B. and Herman, J. G. 2000. *DNA Hypermethylation in tumorigenesis : epigenetic joins genetics*. Trends Genet J Vol. 16, p. 168-174.
- Budhy , S . Soenarto , H . Yaacob , W . Ngeow. 2001. *Changing incidence of oral and maxillofacial tumours in East Java, Indonesia, 1987–1992. Part 2: Malignant tumours* . British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Vol. 39 , Issue 6 , p. 460 – 464.
- Caiafa P, Zampieri M. 2005. *DNA methylation and chromatin structure: The puzzling CpG islands*. J Cell Biochem Vol. 94. p. 257-265.
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, *et al*. 1999. *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. Nat Genet 21. p. 103-107.

- Chan EC, Lam SY, Tsang KW, Lam B, Ho JC, Fu KH, Lam WK, Kwong YL . 2002. *Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage*. Clin Cancer Res 8. p. 3741–3746.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, et al. 2003. *Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine*. J Natl Cancer Inst Vol. 95. p. 399-409.
- Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F. 2005. *Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family*. J Cell Biochem 95. p. 902-917.
- Choi, S. and Myers, J.N. 2008. *Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy*. International and American Associations for Dental Research, USA. *J Dental Research* 87 (1): p.14-32.
- Das P M & Singal R. 2004. *DNA Methylation and Cancer*. American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol Vol. 22. p. 4632-4642.
- Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. 2000a. *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med 343. p. 1350-1354.

- Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. 1999. *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. *Cancer Res* Vol. 59. p. 793–797.
- Esteller, Manel. 2005. *Aberrant DNA Methylation As A Cancer-Inducing Mechanism*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* Vol. 45, p. 629-656.
- Esteller, Manel. 2000b. *Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer : promoter hypermethylation of DNA repair genes*. *Eur J Cancer*, Vol. 36, p. 2294-2300.
- Esteller, Manel. 2003. *Relevance of DNA methylation in the management of cancer*. *The Lancet Oncology*, Volume 4, Issue 6, June 2003, p. 351-358.
- Fabricio L V, Beatriz Z V, et al. 2008. *Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading*. *BMC Oral Health* 8:25. p. 1472.
- Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ, Jones PA. 2005. *"Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level"*. *Nucleic Acids Res* 33 (20), p. 176.

- Finkelstein J, Martin J. 2000. *Homocysteine* . Int J Biochem Cell Biol 32 (4). p. 385–389.
- Födinger M, Hörl W, Sunder-Plassmann G. 2000. *Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase* . J Nephrol 13 (1). p. 20–33.
- Gervasio, Othon L. A. S. 2001. *Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 740 Cases in a Brazilian Population*. Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil. Braz Dent J , Vol. 12 , No. 1, p. 57-61.
- Goffin J, Eisenhauer E. 2002. *DNA methyltransferase inhibitors-state of the art*. Ann Oncol Vol. 13. p. 1699-1716.
- Goodman, Jay I. 2000. *Epigenetic Mechanisms of Carcinogenesis: Commentary*. Epigenetics, Genetics, cell cycle, and cancer Science Vol. 277, p.1948-1949.
- Goodman, Jay I and Rebecca E, Watson. 2002. *Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis*. Annual review of pharmacology and toxicology , Vol. 42, p 501-525.
- Guldberg, Jesper Worm Per and Guldberg, Per. 2002. *DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy*. Blackwell Munksgaard, Denmark. Journal of Oral Pathology & Medicine Volume 31 Issue 8, p. 443 – 449.

- Herman JG, Baylin SB. 2003. *Gene silencing in cancer is association with promoter hypermethylation*. N Eng J Med Vol. 349. p. 2042-2054.
- Ibsen, Olga A. C. 1996. *Oral pathology for dental hygienist*. Ed 2 by W. B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania. Hal. 277-281.
- Issa JP. 2000. *CpG-island methylation in aging and cancer*. Curr Top Microbiol Immunol. Vol. 249. p.101-118.
- Jaenisch R, Bird A. 2003. *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet Vol. 33. p. 254-254.
- Jin Y, Jin C. 2006. *Oral squamous cell carcinoma*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol September 2006. Dept clinical Genetics, University Hospital, SE-221 85 Lund, Sweden., Vol. 164. p. 44-53.
- Jones and Bartlett . 2005. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, 6, Missisauga: Publishers Canada, p. 477.
- Jones PA, Laird PW . 1999. *"Cancer epigenetics comes of age"*. Nat. Genet. 21 (2), p. 163-167.
- Kato, Keizo et all. 2006. *Abberant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa*. Journal Cancer Re Clin Oncol (2006) Vol. 132, p. 735-743.

- Kim SH, Park J, Choi MC, Kim HP, Park JH, Jung Y, Lee JH, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Kim TY. 2007. *Zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1) binds DNA methyltransferase (DNMT) 3B to enhance DNMT3B-mediated transcriptional repression*. *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 355. p. 318-323.
- Kleinsmith, Lewis J. 2006. *Principles of Cancer Biology*. Univ of Michigan, Ann Arbor. Pearson education Inc publishing as Benjamin Cummings, San Fransisco, CA . p: 192.
- Klose RJ, Bird AP. 2006. *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators*. *Trends Biochem Sci*. Vol. 31. p. 89-97.
- Luczak MW, Jagodzinski PP. 2006. *The role of DNA methylation in cancer development*. *Folia Histochem et Cytobiol* Vol. 44. p. 143-154.
- Mashberg, Arthur and Garfinkel, Lawrence. 2008. *Alcohol as a Primary Risk Factor in Oral Squamous Carcinoma*. *CA Cancer J Clin* 31, p. 146-155.
- Mehrotra, R et all. 2006. *Oral squamous cell carcinoma*. Departement of Pathology Univ of Allahabad. India. *Indian journal of cancer*, April-june 2006, Vol. 43, issue 2, p. 60-63.

- Merck . 2005. *Oral Squamous Cell Carcinoma*, The merck manual Online medical library Merck and co., inc. 1995-2008, <http://www.merck.com/mmpe/sec08/ch093/ch093a.html>. Accepted 20 June 2008.
- National Cancer Center. 2008. *Alterations of DNA Methylation during Multistage Carcinogenesis*, <http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/01path/01path01.html>. Accepted 9 July 2008.
- National Cancer Institute. 2004. *Cancer Staging*, <http://www.cancer.gov>. Accepted 6 July 2009.
- Piyathilake, Chandrika J et all. 2005. *Pattern Of Nonspecific (Or Global) DNA Methylation In Oral Carcinogenesis*. Pubmed Central Journal, Head Neck, 2005 December; 27 (12), p. 1061–1067.
- Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, et al. 2000. *Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2_-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter*. Cancer Res 60. p. 6039-6044.
- Rahmadansyah A. 2001. *Perawatan Karsinoma Sel Skuamosa di bibir*. dentika dental journal Vol. 6. No 1.hal 159-164.

- Regezi and Sciubba, 1993. *Oral Pathologi Clinical-pathologic Correlation*, 2nd Ed, WB. Saunders Co.p 261-264.
- Richardson B. 2003. *Impact of aging on DNA methylation*. Ageing Res Rev Vol 2. p. 245-261.
- Robert MF, Morin S, Beaulieu N, et al. 2003. *DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells*. Nat Genet 33 . p. 61-65.
- Roje S. 2006. *S-Adenosyl-L-methionine: beyond the universal methyl group donor*. Phytochemistry 67 (15). p. 1686–1698.
- Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch W, Jen J, Herman J, Sidransky D. 2000. *Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients*. Cancer Res 60. p. 892–895.
- Sato N, Maehara N, Su GH, et al. 2003. *Effects of 5-aza-2_-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness*. J Natl Cancer Inst 95. p.327-330.
- Sato N, Ueki T, Fukushima N, Iacobuzio-Donahue CA, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. 2002. *Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas*. Gastroenterology 123. p. 365–372.

- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006). *"A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters"*. Proc Natl Acad Sci USA 103 (5), p. : 1412–1417.
- Segura-Pacheco B, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, *et al.* 2003. *Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy*. Clin Cancer Res 9 . p. 1596-1603.
- Sekiya T, Kazazian HH, Klein G, Moser HW, Orkin SH, Roizman B, Thakker RV, Watkins H. 2002. *Methyl-CpG binding protein*. Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine. Vol 3. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, Inc, New York. p. 2069-2071.
- Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N, Jiang A, Perou CM, Kim YH, Pollack JR, Fong KM, Lam CL, Wong M, Shyr Y, Nanda R, Olopade OI, Gerald W, Euhus DM, Shay JW, Gazdar AF, Minna JD. 2006. *A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies*. PLOS Medicine 2. p. 2244-2263.
- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. 2001. *Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas*. Oral Oncol 37 . p. 498–504.

- Shivapurkar N, Stastny V, Suzuki M, Wistuba II, Li L, Zheng Y, Feng Z, Hol B, Prinsen C, Thunnissen FB, Gazdar AF. 2007. *Application of a methylation gene panel by quantitative PCR for lung cancers*. *Cancer Lett* 247. p. 56-71.
- Soames, J V & Southam, J C. 1998. *Oral Pathology* , Third edition. Oxford university press inc, New york. p. 162-167.
- Soegiarti Pitojo, 2001. *Karsinoma Sel Skuamosa di Rongga Mulut*. *Dentik: Dental Journal* Vol. 6 No.1, hal 221-224.
- Strathdee G, Brown R. 2002. *Epigenetic cancer therapies: DNA methyltransferase inhibitors*. *Expert Opin Investig Drugs* 11. p. 747-754.
- Sulewska, Anetta. 2007. *DNA methylation in states of cell physiology and pathology*. *Folia Histochemica Et Cytobiologica J*, Vol. 45, No. 3, p. 149-158.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, et al. 2003. *Histone deacetylases: Unique players in shaping the epigenetic histone code*. *Ann N Y Acad Sci* 983. p.84-100.
- Tokugawa T, Sugihara H, Tani T, Hattori T . 2002. *Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Res* 62. p. 4938–4944.

- Torre, Jorge. 2006. *Head and Neck Cancer: Squamous Cell Carcinoma*,
http://www.emedicine.com/plastic/plastHEAD_AND_NECK.htm.
Accepted 13 June 2008.
- Ulrich, Cornelia M. 2008. *Diet, DNA Methylation and Other Epigenetic Events, and Cancer Prevention*, <http://prevention.cancer.gov/funding/recently-funded/ca03016/1r01ca10543701>. Accepted 30 Apr 2008.
- Virtual Center Cancer. 2008. *Oral Cancer (Squamous Cell Carcinoma of the Floor of the Mouth)*,
<http://www.virtualcancercentre.com/diseases.asp?catid=79&did=612> .
Accepted 11 June 2008.
- Virtual Cancer Center. 2008. *Tongue Cancer (Squamous Cell Carcinoma of the Tongue)*,
<http://www.virtualcancercentre.com/diseases.asp?catid=79&did=612> .
Accepted 11 June 2008.
- Viswanathan, MuthuSAMy et al. 2003. *Genomic Instability and Tumor-specific Alterations in Oral Squamous Cell Carcinomas Assessed by Inter-(Simple Sequence Repeat) PCR*. University of California San Diego, School of Medicine, La Jolla, California. *Clinical Cancer Research Journal* Vol. 9, March 2003, p.1057–1062.

- Volkers, Nancy. 2000. *DNA Methylation: What Is Its Role in Carcinogenesis?*. Oxford University Press. Journal of the National Cancer Institute, May 17, 2000, Vol. 92, No. 10, p. 789-790.
- Weinberg, Mea A. and Estefan, Denise J. 2002. *Assessing Oral Malignancies*. American Academy of Family Physicians, New York. American Family Physician Journal April 1, 2002; 65, p. 1379-84, 1385-6.
- Wikipedia. 2008. Wikimedia Foundation, Inc. Available from: <http://id.wikipedia.org/wiki/Tumor> . Accepted 8 Jun 2008.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. 2007. *DNA hypomethylation and human diseases*. Biochim et Biophys Acta 1775. p. 138-162.
- Yakushiji, Takashi. 2001. *Analysis for role p16/ CDKN2 expression and methylation patterns in human Oral Squamous Cell Carcinoma*. Bull Tokyo dent Coll Vol. 42, No. 3. p. 159-168.
- Zhang J, Wan S, et al. 2002. *Tumor p16M is a possible marker of advanced stage in non-small cell lung cancer*. J Surg Oncol 79. p.101-106.