

# **DISERTASI**

## **ANALISIS MOLEKULER PATOGENESIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA RONGGA MULUT BERDASARKAN POLA MUTASI GEN p53 DAN p16**

**Penelitian Observasional Analitik Laboratorik  
Dengan Pendekatan Biologi Molekuler**



**PETER AGUS**

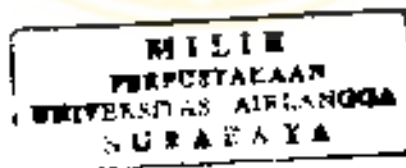
**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2004**



# **ANALISIS MOLEKULER PATOGENESIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA RONGGA MULUT BERDASARKAN POLA MUTASI GEN p53 DAN p16**

## **DISERTASI**

Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran  
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga  
Telah dipertahankan di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Selasa  
Tanggal : 28 September 2004  
Pukul 10.<sup>00</sup> WIB

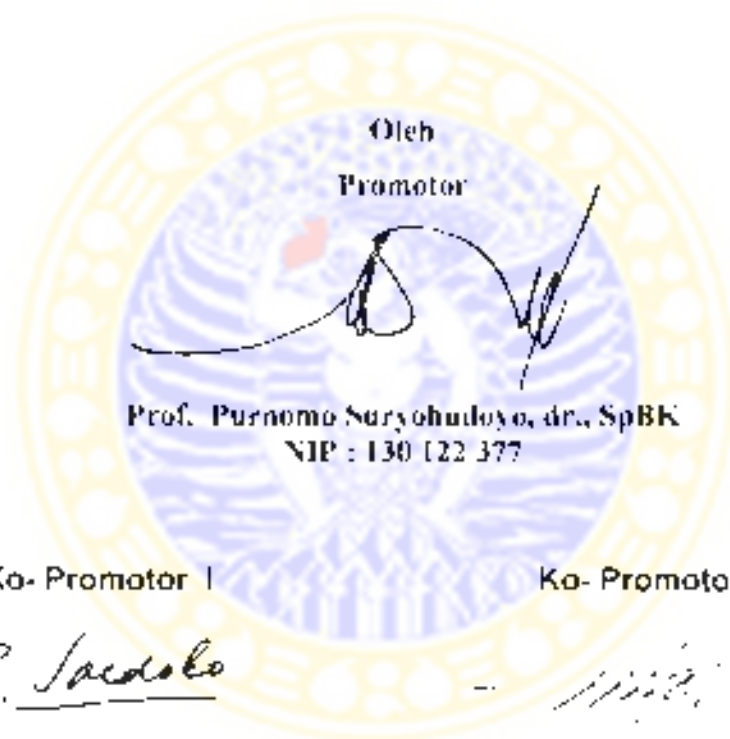


Oleh :

**PETER AGUS**  
NIM. 099913642 D

**Lembar Pengesahan**

**DISERTASI INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 28 OKTOBER 2004**



Oleh  
Promotor

Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK  
NIP : 130 122 377

Ko-Promotor I

Ko-Promotor II

*R. Saedoko*

*Widya Asmara*

Prof. Dr. Roemwerdiniadi S.dr., SpPA  
NIP : 130 197 905

Widya Asmara drh., M.S., PhD  
NIP: 130 779 440

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)  
Tanggal 27 Agustus 2004

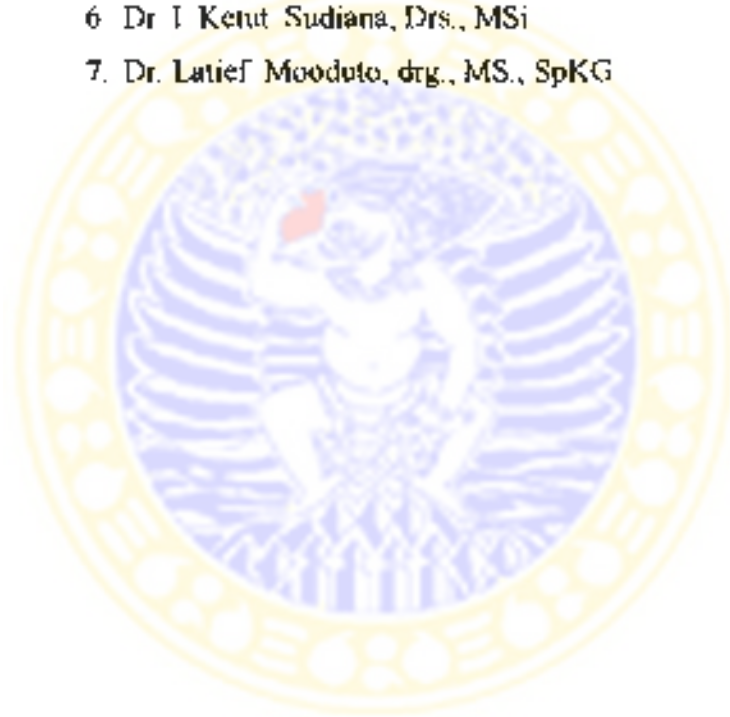
---

**Panitia Penguji Disertasi**

**Ketua** : Prof. Dr. Sudarto Witjokusumo, drg., SpBM

**Anggota** :

1. Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK
2. Prof. Dr. Roemwerdiniadi S, dr., SpPA
3. Prof. Kuntoro, dr., MPH, Dr.PH
4. Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D
5. Wayan T. Artama, drh., M.S., Ph.D
6. Dr I Ketut Sudiana, Drs., MSi
7. Dr. Latief Moodoto, drg., MS., SpKG



Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomor: 6424/JO3/PP/2004  
Tanggal 1 September 2004

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada :

Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK sebagai Promotor yang telah banyak memberikan perhatian, inspirasi, bimbingan, saran, dukungan dan semangat untuk memecahkan segala persoalan terutama yang berkaitan dengan pemahaman ilmu dan teknologi biologi molekuler sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr., SpPA sebagai Ko-Promotor I yang banyak memberikan arahan, bimbingan, dorongan semangat dan penuh kasih telah membuka wawasan pengetahuan di bidang patologi kanker rongga mulut yang sangat berarti dalam disertasi ini

Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D sebagai Ko-Promotor II dan Kepala Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, yang selalu menyediakan waktu dan banyak memberikan arahan, bimbingan yang berharga melalui diskusi yang intensif serta berbagai masukan dan ide yang sangat berharga dalam memahami konsep ilmu dan terapan biologi molekuler kanker sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Dr. Med Puruhito, dr., SpB.,TKV juga mantan Rektor Universitas Airlangga Prof. H. Soedarto, dr., DTM & H, Ph.D atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr., SpP(K), juga mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Soedijono Tirtowidardjo, dr., SpJHT(K), yang telah memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Doktor di Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., SpKG dan mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Unair, Prof. Dr. Hj. Juliati Hood Alsagoff, dr., MS., Sp.PA., FIAC atas segala arahan dan nasehat yang diberikan beliau selama mengikuti Program Doktor.

Direktur RSUD Dr. Soetomo H. Slamet Riyadi Yuwono, dr., DMTH., MARS serta mantan Direktur Prof. M. Dikman Angsar, dr., SpOG, H. Abdus Syukur, dr., SpBD atas ijin dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk melaksanakan penelitian selama mengikuti Pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp.Perio dan mantan Dekan Dr. Budihardjo, drg., MSc., Sp.Perio yang telah memberikan ijin dan kesempatan untuk mengikuti Pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepala Bagian Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga R.M. Coen Pramono Danudiningrat, drg., SU., SpBM dan juga mantan Kepala Bagian Bedah Mulut FKG Unair Soemartono, drg., MSc., SpBM yang memberikan ijin dan kesempatan serta semangat kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.



Ketua GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD. Dr. Sutomo, Prof. Dr. Pitono Soeparto, dr. SpAK (Alm) yang telah mengizinkan saya untuk menggunakan fasilitas Laboratorium Patobiologi GRAMIK FK Unair, serta staf laboratorium Leny Irawati, Amd dan Bayu Yulianti, Amd yang telah banyak membantu saya dalam proses penyimpanan jaringan sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Ketua *Tropical Disease Centre* Universitas Airlangga Prof. Dr. Yoes Priyatna Dachlan, dr., MSc atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium TDC dan pembimbing penelitian Prof. Dr. Indrayana N, dr., SpF. (Alm), Bapak M. Chusen, Ibu Indah, Ibu Helen yang telah memberikan bantuan sarana serta prasarana untuk penggunaan fasilitas isolasi DNA, pemeriksaan kadar DNA di laboratorium TDC.

Kepala Laboratorium Rekayasa Genetika Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Widya Asmara, drh., MS., Ph.D juga mantan Kepala Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Prof. Sofia Mubarika Haryana, dr., Ph.D; Wayan T Artama, drh., M.S., Ph.D; Bapak Tony Rowadi dan Ibu Nurika Ekawati yang dengan profesional dan dengan kesabarannya tetap selalu senantiasa membimbing saya dalam melakukan penelitian di Laboratorium Rekayasa Genetika Universitas Gadjah Mada Yogyakarta sehingga meringankan beban pekerjaan saya di laboratorium dan telah banyak memberikan bantuan sarana serta prasarana untuk penggunaan fasilitas isolasi DNA, pemeriksaan kadar DNA, optimasi PCR, PCR-SSCP sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini.

Kepada guru dan dosen saya sejak Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama di Situbondo, Sekolah Menengah Atas di Jember, Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Airlangga di Surabaya, Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis I Ilmu Bedah Mulut pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga di Surabaya, atas pendidikan yang telah diberikan kepada saya.

Para pengajar Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya: Prof. H. Bambang Rahino Seto Kocsoemo, dr; Prof H. Eddy Pranowo Soedihyo, dr., MPH (Alm); Prof. Soetandyo Wignyosoebroto, MPA; Prof. Dr. H. J. Glinka SVD; Prof. Dr Koento Wibisono; Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK, Prof Rahmat Santoso, dr., SpPA; Prof Dr. Sarmanu, drh., MS; Prof Dr. A. Zainuddin, Apt; H. Fuad Amsyari, dr., MPH., Ph.D; Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., M.S; Dr. F. M. Judayana, dr , SpPK; Dr Irwan Setiabudi, dr; Dr. I Ketut Suidiana, Drs., MSi; Siti Pariani, dr., M.S., PhD; Dr. L. Dyson, Drs., M.S, Prof Koentoro, dr., MPH., Dr.PH, Widodo J. Pudjarahardjo, dr., M.S., MPH., Dr.PH; Prof. H Santoso, dr; yang telah menambah dan meningkatkan wawasan keilmuan saya selama menempuh pendidikan Doktor.

Para dosen penguji usulan penelitian disertasi Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK; Prof Dr. Roemwerdimadi Soedoko, dr., SpPA; Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D; Prof. Koentoro, dr., MPH., Dr.PH; Prof. Dr. Soedarto Wirjokusumo, drg., SpBM; Wayan T Artama, drh., M.S., PhD; Dr. I Ketut Suidiana, Drs., MSi atas segala koreksi serta masukan perbaikan penelitian sehingga penelitian disertasi ini dapat diteruskan.

Para panitia ujian doktor tahap I (tertutup) disertasi Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK; Prof. Dr. Roemwerdimadi Soedoko, dr., SpPA, Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D; Prof. Koentoro, dr., MPH., Dr.PH; Prof. Dr. Soedarto Wirjokusumo, drg , SpBM; Wayan T Artama, drh., M.S., PhD. Dr. I Ketut Suidiana,



Drs., M.Si; Dr. Latief Mooduto, drg., M.S., SpKG atas segala koreksi serta masukan perbaikan penelitian untuk penyempurnaan disertasi ini.

Para panitia ujian doktor tahap II (terbuka) disertasi Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., SpBK; Prof. Dr. Roemwerdiniadi Soedoko, dr., SpPA; Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D; Prof. Dr. Hj. Juljati Hood Alsagaff, dr., MS., Sp.PA., FIAC; Prof. Dr. Hadi Soenartyo, drg., MSc., SpPM; Prof. Dr. Krisnowati, drg., SpPros; Prof. Dr. Eddy Rahardjo, dr., SpAn., KIC; Prof. Dr. Siti Sumariyah, drg., SpPM; Prof. Dr. Soedarto Wirjokusumo, drg., SpBM; Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MSc., SpKG atas segala koreksi serta masukan perbaikan penelitian untuk penyempurnaan disertasi ini.

Para undangan akademik ujian doktor tahap II (terbuka) yaitu Dr. Sudarti, Dra., M.Kes; Dr. Bambang Guruh Irianto, Ir., AIM., M.M; Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes; Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes., Dr. M. Khoidin, SH., MH.Cn; Soedjoko Hariadhi, dr., M.S; Indah Listiana Kriswandini, drg., M.Kes; Retno Indrawati R, drg., MSc; IGA Wahyu Ardani, drg., M.Kes; Diah Savitri E, drg., M.Kes; Hj. Djelita Rickum, SKM., M.Kes; Eha Renwi, drg., M.Kes; Isnindiah Koerniati, drg atas kehadirannya dan dukungannya dalam acara ujian doktor terbuka.

Irawan Yusuf, dr., Ph.D dan Yulius Yulianto Setiady, Ph.D dari Institut Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta yang banyak memberikan bimbingan, masukan serta dorongan untuk lebih mendalami ilmu dan terapan biologi molekuler dalam menempuh Pendidikan Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Dr. Widodo Ario Kencono, dr., SpTHT dan Bakti Surarso, dr., SpTHT di Instalasi GBPT kamar bedah THT RSUD. Dr. Sutomo yang banyak membantu saya

dalam pengumpulan sampel penderita kanker rongga mulut, dengan ijin dan bantuan beliau maka penelitian saya bisa berjalan dengan baik.

Dr. I Ketut Sudiana, Drs., MSi yang selalu memberikan bimbingan, arahan dan dukungan dengan penuh kesabaran dan terus menerus memberikan semangat kepada saya dalam melaksanakan penelitian sehingga penulisan disertasi ini dapat selesai.

Dr Thomas Penuri, drs., MSi; Dr. Hari Basuki, dr., MSi. dan Koesnoto, drh., MSi yang telah banyak meluangkan waktu dan tenaganya untuk membantu dalam analisis statistik dan mengolah data statistik penelitian untuk disertasi ini.

Khusus kepada Dr. Soetopo, drg., MSc., yang telah banyak membantu, memberikan semangat serta dorongan agar cepat menyelesaikan segala administratif dan segala keperluan yang menyangkut penyelesaian naskah disertasi agar masa studi tepat waktu, terima kasih tak terhingga saya sampaikan kepada beliau.

Soewarni DS, drg; Dr. Djoko Agus Purwanto, Drs., MSi., Apt; Dr. Latief Mooduto, drg., M.S., SpKG; Dr. Sudarti, Dra., M.Kes; Remo Pudji Rahayu, drg., M.Kes, yang selalu memberikan dukungan moral dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepada semua teman peserta didik Program Pascasarjana Universitas Airlangga Program Studi Ilmu Kedokteran Angkatan 1999/2000, khususnya Dr. Sudarti Dra., MKes; Dr. David S Perdanakusuma, dr., SpBP; Dr. Sunaryo Hardjowijoto, dr., SpB., SpU; Dr. Yuwono Soeroso, dr., MSc., SpPD; Dr Bambang Guruh Irianto, Ir., AIM., MM; Soedjoko Hariadhi, dr., MS; Titek Bernyanti, drg., M.Kes, Ririn Yudhastuti, drh., MSc; Suwarno, drh., MSi atas kerjasama, pengertian dan bantuannya telah memberikan semangat kepada saya untuk dapat menyelesaikan Pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Kepada semua staf sekretariat Program Pascasarjana Universitas Airlangga, khususnya Ibu Siswatin, Bapak Kumaidi, Ibu Wilujeng Nurfianti, SE, Bapak Rochani, Bapak Sumarno, Bapak Patno, Bapak Abdul Jumadi dan Bapak Suparjanto SH yang telah banyak membantu dalam penyelesaian administrasi selama saya mengikuti program pendidikan Doktor ini

Kepada semua teman sejawat, pegawai, Guru Besar dan pimpinan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah mendorong dan mendukung Pendidikan saya.

Kepada semua teman sejawat, pegawai, Guru Besar dan pimpinan di Bagian Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga: Prof. Dr. Soedarto Wijokusumo, drg., SpBM; R.M. Coen Pramono Danudiningrat, drg., SU, SpBM; Moedjani Darmosewojo, drg., SpBM; Soemartono, drg., MSc, SpBM; Endrajana, drg., M.S., SpBM; Bambang Suryanto, drg., M.S; Herdi Eko Pranyoto, drg., SU., SpBM; Achmad Harijadi, drg., M.S., SpBM; Santo Hudyono, drg., SpBM; Djodi Asmara, drg., SU, SpBM; Roberto M.Y. Simandjuntak, drg., M.S., SpBM; R. Soesanto, drg., SpBM; M. Lukman Bahar, drg., M.Kes; Sigit Sulisty, drg., (Alm), David B. Kamadjaya, drg; R. Aries Muharram, drg., serta mantan staf dosen Bagian Bedah Mulut: Prof. Soedarmadi, drg., SpBM; Benny Sri Subandriyo, drg; Sutoyo W drg., M.S., SpBM (Alm); H. Basoeseno, drg., M.S., SpBM; Bambang Saptoyono, drg., SpBM yang telah memberikan pengertian, mendorong dan mendukung pendidikan saya serta keikhlasan memberikan kelonggaran dalam pelaksanaan tugas sehari-hari di Bagian Bedah Mulut sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Kepada semua penderita atas kesediaannya serta kerelaannya untuk berpartisipasi dalam penelitian ini

Kepada kedua orang tua saya P. Yohannes (Alm) dan R. Roeminten, Mertua saya Prof. Made Sukahatya, dr., SpPD-KGH. dan Ibu Mertua Ayu Rai Sulastri sembah bakti saya haturkan atas segala kasih sayang dan didikannya yang tidak pernah berhenti untuk mendoakan, mendukung dan mendorong saya agar dapat menyelesaikan pendidikan dengan lancar pada Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga

Istri saya Putu Ayu Sulistyani, dr yang selalu setia mendampingi dan anak-anakku yang tercinta Dian Revita Khrisanti, Randy Septian Revianto, Dhani Novitasari atas segala pengertian, pengorbanan, ketulusan dan doa yang selalu dipanjatkan pada saya sehingga memberikan dorongan semangat untuk dapat menyelesaikan Pendidikan Program Doktor ini.

Kepada seluruh keluarga, semua pihak yang belum dapat saya sebutkan namanya satu persatu yang telah membantu dan meringankan beban saya selama pendidikan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam bentuk moril maupun materiil sehingga saya dapat menyelesaikan Program Doktor ini, semoga Tuhan memberkati dan senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya. Amin.



## RINGKASAN

### Analisis Molekuler Patogenesis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut Berdasarkan Pola Mutasi Gen p53 Dan p16

Peter Agus

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) adalah jenis kanker rongga mulut yang berasal dari jaringan epitel keratinosit rongga mulut yang terjadi akibat mutasi gen spesifik pada gen regulator. Gen supresor tumor (GST) p53 dan p16 merupakan target gen regulator spesifik yang penting pada kontrol siklus sel kanker dan yang paling sering mengalami mutasi pada berbagai kanker termasuk KSSRM melalui jalur yang berbeda. Frekuensi mutasi GST p53 dan p16 bervariasi di berbagai negara dan populasi etnis di dunia. Berbagai penelitian sering menghubungkan adanya mutasi GST p53 dan p16 dengan parameter klinikohistopatologis seperti umur, jenis kelamin, lokasi tumor, faktor resiko perokok/penginang, status TNM, stadium klinis, KSSRM diferensiasi sel baik dan jelek.

Tujuan penelitian ini adalah mengungkap patogenesis molekuler karsinoma sel skuamosa rongga mulut melalui pola mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 serta hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis. Pada penelitian ini dilakukan observasional analitik laboratorik dengan pendekatan biologi molekuler terhadap data yang bersifat *crosssectional*. Sampel penelitian: jaringan KSSRM; n=40, usia 40 th sampai > 60 th dan kontrol; jaringan normal, n=16, usia 18-25 th, diambil dari populasi penderita normal dan KSSRM yang datang ke Laboratorium Bedah Mulut dan Poliklinik Onkologi THT RSUD. Dr. Sutomo. Pada jaringan KSSRM dan kontrol dilakukan optimasi PCR dan analisis PCR-SSCP dengan pengecatan perak nitrat. Hasil deteksi mutasi GST p53 didapatkan dari mutasi GST p53 ekson 5 dan atau ekson 7 sedangkan mutasi GST p16 didapatkan dari mutasi GST p16 ekson 1 dan atau ekson 2.

Data penelitian dilakukan analisis untuk membedakan kejadian mutasi pada GST p53 dan p16 pada KSSRM dengan menggunakan *Cochran's Q Test*. Hasil uji beda antara mutasi GST p53 sebanyak 28 kasus 28/40 (70%); ekson 5, 11 kasus 11/40 (27,5%); ekson 7, 22 kasus, 22/40 (55%) disertai mutasi heterozigot 22 kasus 22/22 (100%) dengan GST p16 sebanyak 14 kasus 14/40(35%); ekson 1, 14 kasus 14/40 (35%) disertai mutasi homozigot 10 kasus 10/14 (71,4%); ekson 2, 6 kasus 6/14 (15%) terdapat perbedaan signifikan ( $p=0,002$ ).

Data penelitian untuk analisis uji hubungan kejadian mutasi pada GST p53 dan p16 pada KSSRM dengan parameter klinikohistopatologis menggunakan *Contingency coefficient*. Hasil uji hubungan antara umur 40-50 th (36,4%), 51-60 th (75%), >60 th (90%) dengan mutasi GST p53 (70%) didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,007$ ) terutama p53 ekson 7 (55%),  $p=0,006$  sedangkan hasil uji hubungan antara umur 40-50 th (36,4%), 51-60 th (35%) >60 th (33,3%) dengan mutasi GST p16 (35%) tidak didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,990$ ) Hasil uji hubungan antara perokok/penginang (82,1%) dan tidak perokok/penginang (41,7%) dengan mutasi GST p53 (70%) pada KSSRM didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,010$ ) terutama p53 ekson 7 (55%);  $p=0,013$  sedangkan hasil uji hubungan antara mutasi perokok/penginang (42,9%) dan tidak perokok/penginang (16,7%) dengan mutasi



GST p16 (35%) pada KSSRM tidak didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,112$ ). Hasil uji hubungan stadium klinis I-II (42,9%) dan III-IV (84,6%) dengan mutasi GST p53 (70%) pada KSSRM didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,006$ ) terutama p53 ekson 7 (55%);  $p=0,014$  sedangkan hasil uji hubungan stadium klinis I-II (28,6%) dan III-IV (38,5%) dengan mutasi GST p16 (35%) pada KSSRM tidak didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,532$ ). Hasil uji hubungan pada penderita KSSRM diferensiasi sel baik (60%) dan jelek (80%) dengan GST mutasi p53 (70%) tidak didapatkan hubungan signifikan ( $p=0,168$ ) kecuali mutasi p53 ekson 5 (27,5%) terdapat hubungan yang signifikan dengan penderita KSSRM diferensiasi sel baik dan jelek ( $p=0,013$ ) sedangkan hasil uji hubungan KSSRM diferensiasi sel baik (20%) dan jelek (50%) dengan mutasi p16 (35%) terutama p16 ekson 1 (35%),  $p=0,047$ .

Kesimpulan hasil uji beda dan hubungan antara mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM menunjukkan GST p53 paling sering terlibat dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM dan tidak terpengaruh aktivitasnya oleh peran GST p16 dalam jalur siklus sel KSSRM, terdapat hubungan yang signifikan dengan umur ( $p=0,006$ ) menunjukkan mutasi p53 lebih sering terjadi pada usia tua terutama pada ekson 7, pengaruh perokok/penginang ( $p=0,013$ ) merupakan faktor resiko pemicu perubahan genetik spesifik pada KSSRM, GST p53 paling banyak ditemukan pada stadium lanjut, terutama pada ekson 7 dan berhubungan dengan transformasi fenotip keganasan ( $p=0,014$ ) dan tidak terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,525$ ) dengan KSSRM diferensiasi baik maupun jelek kecuali p53 ekson 5 ( $p=0,013$ ) sehingga GST p53 ekson 7 dapat dijadikan target diagnosis dan prognosis molekuler KSSRM dan merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan signifikan dengan gambaran klinis KSSRM dan p53 ekson 5 dapat dijadikan target diagnosis dan prognosis molekuler KSSRM dan merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan signifikan dengan gambaran HPA KSSRM. Gen supresor tumor p16 tidak didapatkan hubungan yang signifikan dengan umur ( $p=0,990$ ), perokok/penginang ( $p=0,112$ ), stadium klinis ( $p=0,532$ ) kecuali terdapat hubungan signifikan dengan KSSRM diferensiasi sel baik dan jelek terutama pada ekson 1 (35%),  $p=0,047$ . Hal ini menunjukkan GST p16 ekson 1 memegang peranan penting dalam progresivitas KSSRM dan dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM.

## SUMMARY

### **The Molecular Pathogenesis Analysis of Oral Squamous Cell Carcinoma Based on The Pattern of Tumor Suppressor Gene p53 and p16 Mutations**

Peter Agus

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a type of oral cancer which derives from epithelial tissue oral keratinocytes which had mutation gene in specific key target regulatory genes. The tumor suppressor gene (TSG) p53 and p16 are a specific key target regulatory genes in cell cycle control which had most frequently mutations in several human tumor including in OSCC via different pathway. The incidence of TSG p53 and p16 mutations in OSCC were found varied in several countries and ethnic population in the world. Several studies have also been associated the presence of TSG p53 and p16 mutations with clinicopathological parameters such as age, gender, tumor location, risk factor of betel quid chewing or cigarette smoking habits, TNM status, clinical stage, well differentiated and poorly differentiated OSCC.

The purpose of this studies is to elucidate molecular pathogenesis of OSCC through the pattern of TSG p53 and p16 gene mutations also associate with clinic and histopathologic feature. Analytical observations laboratoric comparative study using cross sectional design was used with molecular biology approach. Research sample: OSCC tissue; n=40; age 40 yr till over 65 yr and control patients; normal tissue, n=16; age 18–25 yr which were taken from population of normal and OSCC patients visiting to the laboratory of oral surgery and out patients clinic in Oncology ENT RSUD Dr. Sutomo. In this study, PCR optimization and PCR-SSCP analysis with silver nitrat staining were done for detection of TSG p53 and p16 mutations in OSCC and normal tissue. The result of TSG p53 mutations was obtained from exon 5 and or exon 7 of p53 gene mutations, while TSG p16 mutations was obtained from exon 1 and or exon 2 of p16 gene mutations.

Research data were analyzed for differences between TSG p53 and p16 mutations using Cochran's Q test showed p53 gene mutations were detected in 28 cases 28/40 (70%); 11 cases 11/40 (27,5%) in exon 5; 22 cases 22/40 (55%) with heterozygous mutation 22 cases 22/22 (100%) in exon 7 and p16 gene mutations were found 14 cases 14/40 (35%); 14 cases 14/40 (35%) with homozygous mutations 10 cases 10/14 (71,4%) in exon 1; 6 cases 6/40 (15%) in exon 2, a statistically significant difference were found between the incidens of TSG p53 and p16 mutations ( $p=0,002$ ).

Research data were analyzed for associates between clinicopathological parameters and the incidens of TSG p53 and p16 mutations using Contingency coefficient showed the incidens of TSG p53 mutation (70%) was significantly associated with age 40-50 yr (36,4%), 51-60 yr (75%), >60 yr (90%), ( $p=0,007$ ) especially in exon 7 of p53 gene (55%);  $p=0,006$ , while the incidens of TSG p16 mutation (35%) was not significantly associated with age 40-50 yr (36,4%), 51-60 yr (35%), >60 yr (33,3%); ( $p=0,990$ ). The incidens of p53 gene mutation (70%) was significantly associated with betel quid chewing or cigarette smoking (82,1%) and no betel quid chewing or cigarette smoking (41,7%); ( $p=0,010$ ) especially in exon 7 of p53 gene (55%);  $p=0,013$  while the incidens of p16 gene mutation (35%) was

not significantly associated with betel quid chewing or cigarette smoking (42,9%) and no betel quid chewing or cigarette smoking patients (16,7%); ( $p=0,112$ ). The insidens of p53 gene mutations (70%) was significantly associated with clinical stage I-II (42,9%) and III-IV (84,6%); ( $p=0,006$ ) particularly in exon 7 of p53 gene (55%);  $p=0,014$  while the insidens of p16 gene mutations (35%) was not significantly associated with clinical stage I-II (28,6%) and III-IV (38,5%); ( $p=0,532$ ). The insidens of p53 gene mutations (70%) was not significantly associated with well differentiated (60%) and poorly differentiated OSCC patients (80%); ( $p=0,168$ ) with the exception in exon 5 of p53 gene (27,5%) was significantly associated with well differentiated and poorly differentiated OSCC patients ( $p=0,013$ ) while the insidens of p16 gene mutations (35%) was significantly associated with well differentiated (20%) and poorly differentiated OSCC patients (50%); ( $p=0,047$ ) especially in exon 1 of p16 gene (35%);  $p=0,047$ .

The conclusion of this study showed that the p53 gene are more frequently involved in molecular pathogenesis of oral cancer as compare to that of p16 gene especially in the cell cycle control of OSCC and its activity are not influence with the inactivity alteration of p16 gene, which was significantly associated with age ( $p=0,006$ ) reveal that mutation of p53 gene occurs at older age, especially in exon 7 and the influence of betel quid chewing or cigarette smoking ( $p=0,013$ ) can be as predisposition risk factor for the genetic alteration in OSCC patients; The p53 gene mutations especially in exon 7 of p53 was found frequently in advance stage and relationship with malignant phenotype transformation ( $p=0,014$ ) which was not significantly associated with well differentiated and poorly differentiated OSCC ( $p=0,525$ ) with the exception of p53 gene mutations in exon 5 ( $p=0,013$ ). Thus, exon 7 of p53 gene could be as a molecular diagnostic and prognostic specific target indicator in OSCC and a hot spot region of p53 gene which was significantly associated with clinical status of OSCC, while exon 5 of p53 gene could be as a molecular diagnostic and prognostic specific target indicator in OSCC and a hot spot region of p53 gene which was significantly associated with histopathological status of OSCC. The p16 mutations was not significantly associated with age ( $p=0,990$ ), betel quid chewing or cigarette smoking ( $p=0,112$ ), clinical stage ( $p=0,532$ ) with the exception of well differentiated and poorly differentiated OSCC especially in exon 1, 35% ( $p=0,047$ ) which indicates that exon 1 of the p16 gene may play as role in the progresivity of OSCC and could be as a molecular diagnostic and prognostic specific target indicator in OSCC.



## ABSTRACT

### The Molecular Pathogenesis Analysis of Oral Squamous Cell Carcinoma Based on the Pattern of Tumor Suppressor Gene p53 and p16 Mutations

Peter Agus

The purpose of this study is to determine the presence of the tumor suppressor genes (TSG) p53 and p16 mutations, and to associate these mutations with the clinical and histopathological status of the OSCC patients in order to elucidate the molecular pathogenesis mechanisms of OSCC based on the pattern of p53 and p16 mutations. Analytical observational comparative study using cross sectional design was used. 40 untreated primary OSCC biopsy sample with varied histories of betel quid chewing or cigarette smoking and normal tissue biopsy material taken from 16 normal patients were analysed for the presence of mutation in the conserved region of the p53 gene (exon 5 and or 7) and the p16 gene (exon 1 and or 2) by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP).

The results of this study showed p53 gene mutations were detected in 28/40 (70 %): exon 5; 11/40 (27,5%) with heterozygous mutation 9/11 (81,8%), exon 7, 22/40 (55%) with heterozygous mutation 22/22 (100%) and p16 gene mutations were found 14/40 (35%): exon 1; 14/40 (35%) with homozygous mutation 10/14 (71,4%) and exon 2, 6 (15%) with homozygous mutation 4/6 (71,4%). A statistically significant difference was found between the incidens of TSG p53 and p16 mutations ( $p=0,002$ ; Cochran's Q Test). The incidens of p53 mutation was significantly associated with age ( $p=0,007$ ), status of cigarette smoking or betel quid chewing ( $p=0,010$ ), clinical stage ( $p=0,006$ ) which was not significantly with well and poorly differentiated with the exception in exon 5 of p53 gene ( $p=0,013$ ) and the incidens of p16 mutation was not significant associated with age status of betel quid chewing or cigarette smoking, clinical stage, however exhibited significant associated with well and poorly differentiated of OSCC especially in exon 1 of p16 gene ( $p=0,047$ ). All data were analyzed for associates between clinicopathological parameters and the incidens of p53 and p16 mutations using Contingency Coefficient.

This study concludes that :1) p53 gene are more frequently involved in molecular pathogenesis of OSCC as compare to that of p16 gene; 2) mutation of p53 gene especially in exon 7 occurs more frequently at older age of OSCC patients, 3) mutation of p16 gene especially in exon 1 occurs equally at older and younger age of OSCC patients, 4) betel quid chewing or cigarette smoking are predisposition risk factor for the acquirement of p53 gene mutation in OSCC patients, 5) betel quid chewing or cigarette smoking are not predisposition risk factor for the acquirement of p16 gene mutation in OSCC patients, 6) mutation of p53 gene especially in exon 7 may play an important role in malignant phenotype transformation of OSCC, 7) mutation of p16 gene may not play indirect in malignant phenotype transformation of OSCC, 8) mutation of p53 gene may not play in the progressivity of OSCC with the exception of mutation in exon 5 of p53 which indicates that in exon 5 of p53 gene may play as role in the progressivity of OSCC, 9) mutation of p16 gene especially in exon 1 of p16 gene may play as role in the progressivity of OSCC.

**Key word :** TSG, p53, p16, mutation, OSCC, age, betel quid chewing, cigarette smoking, clinical stage, well differentiated, poorly differentiated.

**DAFTAR ISI**

	<b>Halaman</b>
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH .....	vi
RINGKASAN.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
DAFTAR ISI.....	xix
DAFTAR TABEL .....	xxvi
DAFTAR GAMBAR .....	xxviii
DAFTAR GRAFIK .....	xxx
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxxii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxxiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang Masalah.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>7</b>
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Epidemiologi Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut ....</b>	<b>8</b>



2.2	Diagnosis Klinis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut ..	10
2.3	Diagnosis Histopatologis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.....	12
2.4	Diagnosis Pasti Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut ..	13
2.5	Prognosis dan Terapi Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut.....	14
2.6	Dasar Molekuler Karsinogenesis.....	16
2.6.1	Karsinogenesis.....	16
2.6.2	Ciri umum sel kanker.....	17
2.6.3	Siklus sel kanker.....	17
2.6.4	Gen – gen pengatur siklus sel kanker.....	20
2.6.5	Jalur p53 dan jalur Rb.....	23
2.6.6	Onkogen dan gen supresor tumor.....	24
2.6.7	Mutasi gen.....	26
2.7.	Perkembangan Teknik Biologi Molekuler.....	30
2.7.1	<i>Polymerase chain reaction</i> ( PCR).....	30
2.7.2	<i>Analisis single strand conformation polymorphism</i> (SSCP).....	34
2.8.	Dasar Molekuler Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut. ....	34
2.9	Deteksi Mutasi Gen .....	37
2.10	Gen Supresor Tumor p53.....	43
2.11	Gen Supresor Tumor p16.....	44
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS .....</b>		<b>46</b>
3.1	Kerangka Konseptual Penelitian .....	46

3.2	Hipotesis Penelitian.....	49
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>		<b>50</b>
4.1.	Jenis Penelitian.....	50
4.2	Populasi, Sampel Penelitian dan Besar Sampel .....	50
4.3	Teknik Pengambilan Sampel.....	55
4.4	Variabel Penelitian.....	55
4.4.1	Variabel bebas.....	55
4.4.2	Variabel tergantung.....	55
4.4.3	Variabel kendali.....	55
4.5	Definisi Operasional Penelitian.....	55
4.6	Bahan Penelitian.....	59
4.6.1	Bahan untuk penyimpanan jaringan segar .....	59
4.6.2	Ekstraksi DNA.....	59
4.6.3	Isolasi DNA dan pemurnian DNA.....	59
4.6.4	PCR-SSCP.....	59
4.7	Alat Penelitian.....	60
4.7.1	Diagnosis klinis.....	60
4.7.2	Pengambilan jaringan biopsi.....	60
4.7.3	Isolasi DNA.....	60
4.7.4	PCR-SSCP.....	60
4.8	Kerangka Operasional Penelitian .....	61
4.9	Tempat dan Waktu Penelitian.....	62
4.10	Prosedur Pengumpulan Data.....	62
4.10.1	Cara pengambilan sampel biopsi.....	63

4.10.2	Cara penyimpanan sampel biopsi.....	64
4.10.3	Metode PCR-SSCP.....	64
4.11	Cara Analisis Data.....	72
<b>BAB 5 HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN .....</b>		<b>74</b>
5.1	Hasil Penelitian.....	74
5.1.1	Hasil optimasi PCR GST p53 dan p16 pada KSSRM .....	74
5.1.2	Hasil PCR-SSCP GST p53 dan p16 pada KSSRM .....	76
5.1.3	Data hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	79
5.1.4	Data hasil penelitian gambaran klinis dan IIPA dengan kejadian mutasi GST p53 pada KSSRM .....	80
5.1.5	Data hasil penelitian gambaran klinis dan HPA dengan Kejadian mutasi GST p16 pada KSSRM.....	82
5.2	Analisis Hasil Penelitian.....	83
5.2.1	Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM .....	84
5.2.1.1	Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 dan 7 pada KSSRM.....	85
5.2.1.2	Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 dan 2 pada KSSRM.....	86
5.2.2	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	87
5.2.2.1	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM .....	88
5.2.2.1.1	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi GST p53 ekson 5 pada KSSRM .....	89
5.2.2.1.2	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi p53 ekson 7 pada KSSRM .....	90

5.2.2.2	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM.....	91
5.2.2.2.1	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM..	92
5.2.2.2.2	Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.....	93
5.2.3	Hubungan antara perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi p53 dan p16 pada KSSRM.....	94
5.2.3.1	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM..	94
5.2.3.1.1	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM .....	95
5.2.3.1.2	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM .....	95
5.2.3.2	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM.....	96
5.2.3.2.1	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM .....	96
5.2.3.2.2	Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM. ....	97
5.2.4	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM .....	97
5.2.4.1	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM. ....	98
5.2.4.1.1	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM. ....	98
5.2.4.1.2	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM .....	99

5.2.4.2	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM.....	99
5.2.4.2.1	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	100
5.2.4.2.2	Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.....	100
5.2.5	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	101
5.2.5.1	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM.....	101
5.2.5.1.1	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	102
5.2.5.1.2	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM.....	102
5.2.5.2	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM.....	103
5.2.5.2.1	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	103
5.2.5.2.2	Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.....	104
5.3	Rangkuman Hasil Penelitian Uji Beda antara Deteksi Mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	105
5.4	Rangkuman Hasil Penelitian Uji Hubungan antara Gambaran Klinis dan HPA dengan Deteksi Mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	107
<b>BAB 6 PEMBAHASAN.....</b>		<b>110</b>
6.1	Optimasi PCR GST p53 dan GST p16 pada KSSRM.....	110
6.2	Deteksi Mutasi PCR-SSCP GST p53 dan GST p16 pada KSSRM.....	111
6.3	Hubungan antara Gambaran Klinis; Umrut, Perokok/Penginang dan Stadium Klinis dan HPA Diferensiasi Baik dan Jelek dengan Mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM.....	115



6.3.1	Hubungan umur dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM.....	115
6.3.2	Hubungan perokok/penginang dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM. ....	116
6.3.3	Hubungan stadium klinis dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM. ....	118
6.3.4	Hubungan HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM. .	120
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN.....	122
7.1	Kesimpulan .....	122
7.2	Saran. ....	125
	DAFTAR PUSTAKA.....	127
	LAMPIRAN.....	135



**DAFTAR TABEL.**

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil PCR-SSCP GST p53 dan p16 pada KSSRM .....	79
Tabel 5.2 Hasil penelitian gambaran klinis dengan kejadian mutasi GST p53 pada KSSRM.....	81
Tabel 5.3 Hasil penelitian gambaran klinis dengan kejadian mutasi GST p16 pada KSSRM.....	83
Tabel 5.4 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.....	84
Tabel 5.5 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 ekson 5 dan 7 pada KSSRM.....	85
Tabel 5.6 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p16 ekson 1 dan 2 pada KSSRM.....	86
Tabel 5.7 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 pada KSSRM.....	88
Tabel 5.8 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	89
Tabel 5.9 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM.....	90
Tabel 5.10 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 pada KSSRM.....	91
Tabel 5.11 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	92
Tabel 5.12 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM .....	93
Tabel 5.13 Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 pada KSSRM.....	94
Tabel 5.14 Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	95
Tabel 5.15 Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM. ....	95

<b>Tabel 5.16</b>	Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 pada KSSRM .....	96
<b>Tabel 5.17</b>	Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	96
<b>Tabel 5.18</b>	Hasil uji hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.....	97
<b>Tabel 5.19</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 pada KSSRM.. ..	98
<b>Tabel 5.20</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM. ....	98
<b>Tabel 5.21</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM. ....	99
<b>Tabel 5.22</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 pada KSSRM.....	99
<b>Tabel 5.23</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.. ..	100
<b>Tabel 5.24</b>	Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.. ..	100
<b>Tabel 5.25</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 pada KSSRM.....	101
<b>Tabel 5.26</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	102
<b>Tabel 5.27</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM .....	102
<b>Tabel 5.28</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 pada KSSRM. ....	103
<b>Tabel 5.29</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM ..	103
<b>Tabel 5.30</b>	Hasil uji hubungan antara HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM .....	104

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Pengaturan molekuler siklus sel kanker fase G1/S.....	19
Gambar 2.2	Kanker disebabkan adanya mutasi pada gen-gen pengatur siklus sel kanker terutama pada fase G1/S ..	22
Gambar 2.3	<i>Silent mutation</i> kodon ke 5 TTA yaitu leusin berubah menjadi TTG namun tidak merubah asam amino yang dihasilkan yaitu tetap leusin .....	27
Gambar 2.4	Mutasi <i>missense</i> terjadi pada kodon pertama, urutan basa ke-3 sehingga terjadi perubahan asam amino dari penidalanin menjadi leusin .....	28
Gambar 2.5	Mutasi <i>nonsense</i> terjadi pada kodon ketiga, urutan basa ke - 8 menyebabkan terbentuknya kodon terminasi TAG sehingga pembentukan asam amino terhenti .....	28
Gambar 2.6	Mutasi <i>frameshift by addition</i> yaitu penambahan basa menyebabkan insersi pada basa T kodon 4 urutan ke-10 sehingga asam amino yang dihasilkan sangat berbeda.....	29
Gambar 2.7	Mutasi <i>frameshift by delesi</i> menyebabkan delesi pada sekuen pasang basa pasang basa GCTA dan CGAT sehingga terjadi perubahan asam amino yang sangat berbeda.....	30
Gambar 2.8	Prosedur pemeriksaan PCR .....	33
Gambar 2.9	Jalur Transduksi Sinyal.....	36
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual Penelitian.....	48
Gambar 4.1	Kerangka Operasional Penelitian.....	61
Gambar 5.1	Hasil produk PCR GST p53 ekson 5 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol (K) menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 300 bp sesuai dengan marker (M) (visualisasi dengan pewarnaan <i>ethidium bromide</i> ).....	74

<b>Gambar 5.2</b>	Hasil produk optimasi PCR GST p16 ekson 1 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol (K) menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 125 bp sesuai dengan marker (M) (visualisasi dengan pewarnaan <i>ethidium bromide</i> )... ..	75
<b>Gambar 5.3</b>	Hasil produk PCR GST p16 ekson 2 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 307 bp sesuai dengan marker (visualisasi dengan pewarnaan <i>ethidium bromide</i> ) ...	75
<b>Gambar 5.4</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 5 lajur No 3 menunjukkan adanya mutasi homozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).....	76
<b>Gambar 5.5</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 7 lajur No5, 6, 8, 9 dan 10 menunjukkan adanya mutasi heterozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).....	76
<b>Gambar 5.6</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 7 sampel lajur No 22, 23, 24, 25 tidak terdapat adanya mutasi. (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).....	77
<b>Gambar 5.7</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 1 sampel dengan lajur No 3 dan 6 menunjukkan mutasi homozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).....	77
<b>Gambar 5.8</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 1 sampel lajur No 21 dan 29 menunjukkan mutasi heterozigot. (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).....	78
<b>Gambar 5.9</b>	Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 2 sampel lajur No 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 tidak terdapat mutasi (visualisasi pengecatan perak nitrat) .....	78
<b>Gambar 5.10</b>	Hasil penelitian uji hubungan antara status klinis, umur, perokok/penginang, stadium klinis dan data HPA, diferensiasi baik dan jelek dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 serta ekson - eksonnya pada KSSRM . . . . .	107



**DAFTAR GRAFIK**

	Halaman
Grafik 5.1 Hasil proporsi mutasi GST p53 yang lebih tinggi dari GST p16 pada KSSRM. ....	85
Grafik 5.2 Hasil proporsi mutasi GST p53 ekson 7 lebih tinggi dari GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	86
Grafik 5.3 Hasil proporsi mutasi GST p16 ekson 1 lebih tinggi dari GST p16 ekson 2 pada KSSRM.....	87
Grafik 5.4 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 pada KSSRM ....	88
Grafik 5.5 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM. ....	89
Grafik 5.6 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM. ....	90
Grafik 5.7 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 pada KSSRM.....	91
Grafik 5.8 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	92
Grafik 5.9 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM ....	93
Grafik 5.10 Hasil penelitian uji beda antara deteksi mutasi GST p53 dan p16 serta ekson-eksonnya pada KSSRM.....	105

## DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Hasil Produk PCR GST p53 ekson 5 pada KSSRM...	135
Lampiran 2	Hasil Produk PCR GST p53 ekson 7 pada KSSRM....	136
Lampiran 3	Hasil Produk PCR GST p16 ekson 1 pada KSSRM... ..	137
Lampiran 4	Hasil Produk PCR GST p16 ekson 2 pada KSSRM,.....	138
Lampiran 5	Hasil PCR-SSCP GST p53 ekson 5 pada KSSRM.....	139
Lampiran 6	Hasil PCR-SSCP GST p53 ekson 7 pada KSSRM. ...	140
Lampiran 7	Hasil PCR-SSCP GST p16 ekson 1 pada KSSRM.....	141
Lampiran 8	Hasil PCR-SSCP GST p16 ekson 2 pada KSSRM. ....	142
Lampiran 9	Data Hasil Penelitian Observasional Gambaran Klinis dan Histopatologis KSSRM dengan Mutasi p53 dan p16.....	143
Lampiran 10	<i>Ethical Clearance</i> .....	144
Lampiran 11	Lembar Penjelasan Tentang Prosedur Penelitian di Laboratorium Bedah Mulut FKG Unair.....	145
Lampiran 12	Lembar Persetujuan untuk mengikuti Penelitian di Laboratorium Bedah Mulut FKG Unair ( <i>INFORMED CONSENT</i> ).....	146
Lampiran 13	Lembar Penjelasan Prosedur Penelitian di RSUD Dr.Sutomo .....	147
Lampiran 14	Lembar Persetujuan untuk mengikuti Penelitian di RSUD Dr. Sutomo ( <i>INFORMED CONSENT</i> ) .....	148
Lampiran 15	Hasil Uji Statistik.....	149

## DAFTAR SINGKATAN

KSSRM	Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut
RSUD	Rumah Sakit Umum Daerah
WHO	<i>World Health Organization</i>
HPA	Histopatologianatomi
OSCC	<i>Oral Squamous Cell Carcinoma</i>
TSG	<i>Tumor Suppressor Gene</i>
Rb	Retinoblastoma
GST	Gen Supresor Tumor
KRM	Kanker Rongga Mulut
TNM	Tumor Noduli Metastase
UICC	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
KGB	Kelenjar Getah Bening
Go	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G1/S	<i>Gap 1/ Synthesis</i>
S	Sintesis
M	Mitosis
CDK 4,6	<i>Cyclin Dependent Kinase 4, 6</i>
CDKI	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>
CIP1	<i>Cdk Interacting Protein 1</i>
GADD	<i>Growth Arrest on DNA Damage</i>
pRb-P	<i>Phosphorylated Retinoblastoma- Protein</i>
DHFR	<i>Dihydrofolate reductase</i>

<b>TK</b>	<b>Timidin Kinase</b>
<b>POL</b>	<b>DNA polimerase</b>
<b>TS</b>	<b>Timidilat sintase</b>
<b>CDK</b>	<i>Cyclin Dependent Kinases</i>
<b>Phe</b>	<b>Fenilalanin</b>
<b>Arg</b>	<b>Arginin</b>
<b>Ile</b>	<b>Isoleusin</b>
<b>Ala</b>	<b>Alanin</b>
<b>Asn</b>	<b>Asparagin</b>
<b>Leu</b>	<b>Leusin</b>
<b>Met</b>	<b>Metionin</b>
<b>Thr</b>	<b>Treonin</b>
<b>Trp</b>	<b>Triptofan</b>
<b>Gln</b>	<b>Glutamin</b>
<b>Ser</b>	<b>Serin</b>
<b>Tyr</b>	<b>Tirosin</b>
<b>Gly</b>	<b>Glisin</b>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SSCP</b>	<i>Single Strand Conformational Polymorphism</i>
<b>PCR-SSCP</b>	<i>Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformational Polymorphism</i>
<b>dNTP</b>	<b>deoksiribosenukleotida trifosfat</b>
<b>PAGE</b>	<i>Polyakrifamide Gel Electrophoresis</i>

PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i>
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
MDR1	<i>Multidrug Resistance</i>
SMF THT	Satuan Medik Fungsional Telinga Hidung dan Tenggorok
FKG	Fakultas Kedokteran Gigi
FK	Fakultas Kedokteran
GBPT	Gedung Bedah Pusat Terpadu
TDC	<i>Tropical Disease Center</i>
GRAMIK	Graha Masyarakat Ilmiah Kedokteran
EDTA	<i>Ethylenediamin Tetra Acetic Acid</i>
Mg Cl <sub>2</sub>	Magnesium klorida
dH <sub>2</sub> O	Aquades steril
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Karsinoma sel skuamosa merupakan jenis keganasan yang paling banyak dijumpai dalam rongga mulut berkisar 82-97% dan seluruh keganasan pada rongga mulut. Angka kejadian karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) sebanyak 9,2% menempati urutan ke-6 di dunia dan terus meningkat. Prevalensi KSSRM di beberapa negara berkisar 3-20% dari semua kasus kanker. Dalam penelitian catatan medik dari tahun 1983-1992, KSSRM ditemukan 118 kasus (3,3%) di antara 3577 penderita tumor kepala dan leher yang berkunjung ke Poli Kepala Leher RSUD. Dr. Sutomo. Angka kematian yang masih relatif cukup tinggi di seluruh dunia yaitu 5,1% (WHO,1997), sedangkan di Indonesia 2,4%-3,57% dan kebanyakan penderita datang sudah pada stadium lanjut 76,3%. Tingginya angka kematian, morbiditas, dan buruknya prognosis KSSRM masih merupakan permasalahan kanker di dunia dan para klinisi sampai saat ini (WHO, 1997; Ramli, 1999).

Pemahaman mengenai dasar patogenesis molekuler KSSRM belum banyak dipahami sehingga penanganan terapi KSSRM hanya berdasarkan diagnosis klinis dan histopatologianatomi (HPA) saja, dapat menyebabkan kesalahan terapi. Disamping itu sering terjadi ketidaksesuaian antara diagnosis pasti HPA dengan diagnosis klinisnya terutama untuk mendapatkan jaringan bebas tumor pada tepi sayatan pembedahan walaupun dengan pemeriksaan potong beku secara mikroskopik dilaporkan telah bebas dari sel kanker. Namun hal tersebut tidak menjamin akan terjadi kekambuhan kemungkinan tumor ganas telah mengadakan metastasis

regional maupun jauh yang tidak terdeteksi sehingga angka morbiditas dan mortalitas akan semakin bertambah tinggi (Ramli, 1995; Todd *et al.*, 1997).

Saat ini terjadi kecenderungan peningkatan deteksi mutasi yang meletakkan jalur p53 dan Rb sebagai kajian dasar pemahaman mekanisme patogenesis molekuler terutama adanya inaktivasi gen supresor tumor (GST) p53 dan p16 sebagai pusat jalur pengendalian proliferasi siklus sel dan merupakan sasaran jalur penelitian terbanyak di berbagai keganasan termasuk KSSRM (Sherr, 1996; Williams, 2000). Namun pemahaman mekanisme patogenesis molekuler pada KSSRM melalui inaktivasi GST p53 dan p16 sampai saat ini belum diketahui secara jelas.

Frekuensi kejadian mutasi GST p53 pada berbagai kanker di seluruh tubuh merupakan mutasi terbanyak ditemukan rata-rata lebih dari 50% yang terletak di daerah ekson 5-8 terutama ekson 5 dan 7 pada karsinoma kolorektal dan laring (Leahy *et al.*, 1996, Zang *et al.*, 2000). Ada perbedaan frekuensi mutasi di beberapa lokasi kanker seperti pada 60 penderita karsinoma sel skuamosa laring di Cina ditemukan mutasi pada ekson 5-8 dengan menggunakan *polymerase chain reaction - single-strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) rata-rata 78,8% terbanyak pada ekson 5 (50%) dan ekson 7 (41%) sedangkan ekson 8 (25%) dan ekson 6 (11%), yang mempunyai hubungan dengan faktor karsinogen (Zang *et al.*, 2000). Peneliti Kuo *et al.*, (1999) melaporkan mutasi p53 KSSRM jarang terjadi pada ekson 5-9 sebesar 5,4% dan ditemukan mutasi noktah pada kodon 266 di Taiwan. Deteksi mutasi gen p53 pada KSSRM di Inggris dengan menggunakan metode PCR-SSCP didapatkan perbedaan pola migrasi yang menunjukkan adanya mutasi heterozigot sebanyak 15/27 (55%) pada ekson 2-9 (Trivedy *et al.*, 1998). Sedangkan penelitian di India ditemukan mutasi heterozigot GST p53 pada KSSRM sebesar 15% dengan

metode *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) yang sebelumnya dilaporkan frekuensi mutasi heterozigot tinggi pada KSSRM di negara Eropa (Kannan *et al.*, 2000). Peneliti Hsieh *et al.*, (2001) melaporkan kejadian mutasi gen p53 KSSRM sebesar 163/383 (42%) pada beberapa negara seperti Eropa, Amerika, Australia, Cina dan Jepang mempunyai hubungan yang signifikan dengan penggunaan tembakau atau perokok sinergi dengan peminum alkohol. Disamping itu dilaporkan pula kejadian mutasi gen p53 rata - rata sebesar 19,89% mempunyai hubungan yang signifikan dengan penderita KSSRM pengunyah tembakau/penginang di India, Srilanka, Papua Neugini dan Asia Tenggara sedangkan mutasi gen p53 sebesar 91/187 (48,66%) di Taiwan tidak terdapat hubungan signifikan dengan umur, jenis kelamin, stadium klinis, perokok atau pemakan sirih (penginang) kecuali terdapat hubungan signifikan antara peminum alkohol sebesar 56,44% dan tidak peminum alkohol 39,53% dengan kejadian mutasi p53 ekson 5 - 9 dengan  $p = 0,02$  (Hsieh *et al.*, 2001).

Gen supresor tumor pada jalur Rb yaitu p16INK4a (gen p16) merupakan GST terbanyak kedua mengalami mutasi setelah p53 pada berbagai kanker di seluruh tubuh antara 30-50% yang terletak pada *hot spot region* sepanjang ekson 1-3 (Sherr, 1996; Liggett and Sidransky, 1998) Penelitian mutasi gen p16 pada KSSRM masih sedikit dilaporkan dan cenderung meningkat serta diduga delesi homozigot merupakan mutasi yang paling sering terjadi dalam mekanisme inaktivasi gen p16 sebagai penyebab KSSRM sebanyak 78% di Amerika (Shahnavaz *et al.*, 2001) Peneliti lainnya melaporkan mutasi gen p16 pada KSSRM mempunyai korelasi dengan fenotipnya sebanyak 87% di Inggris (Wu *et al.*, 1999) Beberapa peneliti melaporkan jarang terjadi adanya mutasi gen p16 pada KSSRM di India sebesar 1%

yang mempunyai hubungan dengan penderita perokok dan pengunyah tembakau sebesar 27% dan peneliti di Taiwan melaporkan mutasi gen p16 sebanyak 6% (Kannan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). Sedangkan peneliti lainnya melaporkan mutasi gen p16 pada KSSRM dengan pemeriksaan PCR-SSCP didapatkan sebanyak 54% dan terjadi mutasi delesi 14,6% yang tidak mempunyai hubungan signifikan dengan beberapa faktor klinikopatologis seperti lokasi dan stadium klinis kanker namun mempunyai hubungan signifikan dengan status TNM dan diferensiasi selnya yaitu diferensiasi baik dan jelek di Taiwan (Tsai *et al.*, 2001).

Hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada beberapa keganasan termasuk KSSRM di beberapa negara menunjukkan bahwa masih banyaknya kontroversi serta terjadi heterogenitas perubahan genetik yang menyebabkan perbedaan pola mutasi dalam hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis pada berbagai ras, daerah, lokasi tumor dan faktor predisposisi resiko sebagai penyebab terjadinya KSSRM belum sepenuhnya dapat dipahami secara jelas sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengungkap mekanisme patogenesis molekuler KSSRM.

Pada level molekuler, beberapa laporan peneliti menyebutkan bahwa tidak aktifnya GST p53 merupakan faktor utama penyebab KSSRM (Matsumura *et al.*, 1996; Yeudal *et al.*, 1997) yang mempunyai peran langsung dan tidak langsung melalui aktivasi transkripsi gen p21 pada siklus sel terutama pada fase transisi G1/S (Haupt and Oren, 1996, Bartkova *et al.*, 1997). Sedangkan pada jalur sel yang berasal dari karsinoma sel skuamosa ditemukan juga beberapa mutasi gen seperti adanya amplifikasi gen dan delesi di berbagai tempat pada kromosom (Matsumura, 1995). Penelitian ini menunjukkan bahwa ada faktor-faktor genetik



yang lain selain inaktivasi GST p53 yang berpotensi mengakibatkan KSSRM. Peneliti menduga bahwa ada faktor-faktor genetik yang lain selain inaktivasi GST p53 yang berpotensi mengakibatkan KSSRM yaitu GST p16 yang juga mempunyai aktivitas fungsional pada fase transisi G1/S dan akan mentransformasikan perubahan molekuler dari fase G1 ke fase S, dengan demikian mekanisme inaktivasi GST p53 dan p16 pada siklus sel mencerminkan keaktifan suatu sel untuk membelah.

Kanker disebabkan aktivitas pembelahan sel yang tidak terkendali dan tingkat keganasan (derajat) kanker berkorelasi linier dengan aktivitas pembelahan sel sehingga makin banyak sel membelah maka makin aktif suatu sel dan makin ganas kanker tersebut maka untuk membedakan derajat keganasan kanker diperlukan adanya beberapa molekul indikator yang berperan penting di dalam pengendalian fase G1 siklus sel yang dapat merefleksikan aktivitas sel secara langsung pada KSSRM dengan gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek serta hubungannya dengan gambaran klinis maka molekul GST p53 dan p16 ideal untuk indikator diagnosis dan prognosis yang berguna untuk strategi penanganan KSSRM maupun jenis-jenis kanker yang lain.

Berdasarkan ketidakjelasan patogenesis molekuler dan berbagai kendala pada kajian jenjang molekuler permasalahan KSSRM dalam hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis yang belum sepenuhnya dipahami serta mengingat perubahan inaktivasi molekul GST p53 dan p16 yang mempunyai peran sangat penting pada pengaturan molekuler fase transisi G1 siklus sel dan berkorelasi linier dengan aktivitas pembelahan sel yang tidak terkendali maka perlu dikembangkan lebih mendalam dengan menggunakan pendekatan biologi molekuler dengan konsep pola mutasi gen p53 dan p16 sehingga diharapkan dapat mengungkap

dasar patogenesis molekuler KSSRM dan berguna untuk indikator diagnosis pasti, prognosis serta strategi penanganan KSSRM dengan konsep baru dalam cara penanggulangan kanker di klinik secara tepat.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Apakah ada perbedaan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut ?
2. Apakah ada hubungan antara umur dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut ?
3. Apakah ada hubungan antara perokok/penginang dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut ?
4. Apakah ada hubungan antara stadium klinis dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut ?
5. Apakah ada hubungan antara diferensiasi sel baik dan jelek dengan mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan umum**

Mengungkap patogenesis molekuler karsinoma sel skuamosa rongga mulut melalui pola mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 serta hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis

### **1.3.2 Tujuan khusus**

1. Menentukan adanya perbedaan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.
2. Menentukan adanya hubungan antara umur dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut

3. Menentukan adanya hubungan antara perokok/penginang dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
4. Menentukan adanya hubungan antara stadium klinis dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut
5. Menentukan adanya hubungan antara diferensiasi sel baik dan jelek dengan mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1 Manfaat teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi sumbangan mengenai peran GST melalui pola mutasi gen p53 dan p16 dalam mengungkap dasar patogenesis molekuler karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

##### **1.4.2 Manfaat praktis**

Diagnosis molekuler terhadap mutasi GST p53 dan p16 diharapkan dapat menunjang diagnosis klinis dan HPA KSSRM sehingga penanganan penderita akan menjadi lebih baik berdasarkan pada penentuan diagnosis, prognosis yang lebih tepat.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Epidemiologi Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) merupakan jenis keganasan yang paling banyak ditemukan pada kanker rongga mulut (KRM) dengan frekuensi berkisar 82-97% dari seluruh keganasan di rongga mulut dengan angka kejadian di dunia 9,2% (WHO, 1997). di India berkisar 20-30% (Desai, 1994), di Eropa sebanyak 10-15% (Vecchia *et al.*, 1997) dan di Inggris dijumpai 2000 kasus KRM terutama KSSRM serta terus meningkat terutama pada laki laki setiap tahunnya (Zakrzews, 1999). Hasil penelitian selama 5 tahun di RSUD Dr. Sutomo Surabaya menunjukkan insidens KSSRM 90,41% dari seluruh KRM (Agus, 1995), 118 kasus KRM dari sebanyak 3577 penderita tumor kepala dan leher ditemukan di Bagian Seksi Bedah Kepala Leher RSUD Dr. Sutomo (Murtijo dkk, 1995). Dilaporkan 143 kasus KSSRM dari 423 penderita KRM di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran (FK) Universitas Airlangga Surabaya (Hood Yuliaty, 1995). Sementara di RSUD Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta dilaporkan penderita KSSRM sebesar 21,6% dengan stadium lanjut sebesar 76,3% (Ramli, 1999), sedangkan frekuensi distribusi jenis kelamin laki dan wanita 1:1 di Indonesia (Ramli, 1995) dan di dunia 2:1 (WHO, 1997).

Kanker rongga mulut terutama jenis KSSRM sampai saat ini masih merupakan problem kesehatan di dunia dan menempati urutan ke enam dari kanker di seluruh tubuh (WHO, 1997). Insiden umur dan distribusi seks KSSRM di Indonesia terbanyak pada usia 45-65 tahun dengan perbandingan laki wanita 1:1 (Ramli, 1995). Usia termuda 25 tahun dan tertua 73 tahun banyak dijumpai lokasi di



lidah 51,5%, palatum 33,3% dan bibir 15,2% dari 73 penderita KSSRM di Surabaya (Agus, 1995). Sementara di Cina dari 103 penderita KSSRM ditemukan pada usia antara 23 sampai 83 tahun dan lokasi KSSRM pada mukosa bukal 39,8%, lidah 27,2%, gingiva pada mandibula 15,5%, maksila 8%, bibir bawah 7,8% dan mukosa dasar mulut 1%, sedangkan penentuan stadium tumor atau stadium klinis memakai klasifikasi sistem tumor, nodul dan metastasis (sistem TNM), didapatkan stadium I 23%, stadium II 14,6%, stadium III 43,7% dan stadium IV 18,4% (Chen *and* Chen, 1996).

Data angka rata-rata 5 tahun harapan hidup di New York, Amerika Serikat didapatkan stadium I 75%, stadium II 82%, stadium III 37% dan stadium IV 49% (Hermanek, 1995), sedangkan di Cina didapatkan angka rata-rata harapan hidup stadium I 62%, stadium II 80%, stadium III 42% dan stadium IV 19% (Chen *and* Chen, 1996).

Angka kematian di seluruh dunia 5,1% dari seluruh kasus kanker (WHO, 1997), sedangkan di Indonesia 2,4% (Ramli, 1995). Diperkirakan terjadi peningkatan angka kematian KSSRM 3% pada setiap tahunnya dari angka kematian seluruh jenis kanker di Amerika Serikat (King, 1996) Tingginya angka kematian, morbiditas dan buruknya prognosis merupakan permasalahan yang dihadapi para klinisi sampai saat ini walaupun upaya deteksi dini telah dilakukan namun angka harapan hidup rata-rata 5 tahun penderita KSSRM ditemukan 3% pada stadium lanjut jauh lebih rendah dibandingkan kasus kanker lainnya seperti kanker esofagus 5-10%, hati 6%, paru 7%, servikal 10%, abdomen 20%, payudara 50%, kolorektal 90% (King, 1996; WHO, 1997).

Faktor penyebab KRM belum diketahui dengan pasti diduga faktor resiko utama terjadinya KRM adalah multifaktorial akibat faktor eksternal seperti tembakau, alkohol, bahan karsinogenik, radiasi dan virus sedangkan faktor internal seperti faktor perubahan genetik yang multistep dan kompleks menyebabkan bentuk klinis KRM bervariasi tergantung pada faktor penderita resiko tinggi seperti usia, lokasi topografis dan ras (Todd *et al* , 1977). Namun dengan adanya perkembangan biologi molekuler tiga dasawarsa terakhir ini dengan ditunjang oleh teknik-teknik rekayasa genetik sudah dapat dibuktikan sekarang secara pasti bahwa kanker memiliki dasar genetik (Suryohudoyo, 2000), sehingga faktor penyebab KSSRM saat ini banyak ditujukan pada perubahan pengendalian molekuler melalui berbagai jalur terutama pada fase G1/S siklus pembelahan sel dan banyak dikorelasikan dengan gambaran fenotip atau gambaran klinis dan histopatologis (Chen *et al.*, 1999; Sartor, 1999).

## 2.2 Diagnosis Klinis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut

Menurut Ramli, 1995 diagnosis klinis atau kecurigaan adanya KSSRM tidak terlalu sukar dengan melakukan pemeriksaan fisik yang teliti meliputi anamnesis, riwayat penderita dan palpasi dapat menemukan keadaan seperti ulserasi mukosa yang tidak sembuh-sembuh, adanya indurasi tumor yang dirasakan sebagai suatu pembengkakan, ulserasi, kelainan dalam mulut disertai pembesaran kelenjar getah bening leher, adanya lesi di mulut dan sukar buka mulut, gambaran leukoplakia atau eritroplakia dengan riwayat faktor resiko seperti merokok, minum alkohol dan makan stroh maka diagnosis klinis atau kecurigaan pada KSSRM sudah dapat dibuat. Namun menurut Sukardja (1996) tumor yang lebih kecil dan  $\frac{1}{2}$  cm hampir tidak diketahui adanya dengan pemeriksaan klinik maupun penunjang klinik. Peneliti

Todd *et al.*, (1997) berpendapat bahwa faktor eksogen dan endogen yang kompleks mengakibatkan sulitnya mendapatkan kondisi lesi jaringan praganas seperti leukoplakia dan eritroplakia. Sedangkan untuk terjadinya proses transformasi keganasan membutuhkan waktu yang lama untuk mendeteksi adanya tumor praganas. Disamping itu teori *multi step (multi hit)* mendasari proses terjadinya keganasan pada epitel rongga mulut yang dapat di stimulasi setiap saat dengan kecepatan dan lokasi yang berbeda yang akan menimbulkan stadium dengan derajat diferensiasi yang berbeda pula sehingga keadaan lesi pra ganas tidak dapat dilihat secara pengamatan klinis pada saat ditemukan (Todd *et al.*, 1997).

Gambaran klinis KSSRM adalah ulseratif menyerupai kawah dengan dasar merah bergranula disertai tepi lesi yang keras dan membulat. Adanya lesi ulseratif merupakan tipe KSSRM yang infiltratif dengan prognosis jelek akan tetapi lesi ulseratif tersebut kadang-kadang berkembang menjadi tipe eksofitik. Karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang berkembang secara invasif disebut endofitik dan yang tidak invasif disebut eksofitik. Karsinoma sel skuamosa rongga mulut tipe eksofitik dapat menyebar ke permukaan dan bila sudah stadium lanjut akan menjadi invasif sehingga disebut tipe *verrukous* (Agus, 1990).

Penampilan status penderita dipakai untuk mengukur kualitas hidup dapat dibagi menjadi 4 derajat yaitu derajat 0 = baik, dapat bekerja normal tanpa batasan, derajat 1 = cukup, tidak dapat bekerja berat tetapi dapat bekerja ringan; derajat 2 = lemah, tidak dapat bekerja tetapi dapat jalan dan merawat diri sendiri dan lebih dari 50% dari waktu bangun, derajat 3 = jelek, tidak dapat jalan, tetapi dapat bangun sendiri dan perlu tiduran lebih dari 50% dari waktu bangun; derajat 4 = sangat jelek,

tidak dapat bangun dan merawat diri sendiri, penderita hanya tiduran saja di tempat tidur atau kursi (WHO, 1979).

Penelitian mengenai hubungan gambaran klinis KSSRM cenderung meningkat dengan kejadian mutasi pada GST p53 dan p16 yaitu menggunakan parameter umur, lokasi tumor, sistem TNM (Tumor, Noduli, Metastases) dan stadium klinis (Kusama *et al.*, 1996; Ostwald *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000).

### 2.3 Diagnosis Histopatologis Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut secara mikroskopik dibagi atas 2 jenis yaitu kornifikasi dan nonkornifikasi. Adanya pertandukan (kornifikasi) menunjukkan derajat diferensiasi yang baik dan sebaliknya tidak adanya kornifikasi menunjukkan derajat diferensiasi yang jelek (Agus, 1990).

Pembagian derajat diferensiasi berdasarkan konsep Broders yang menyatakan bahwa stadium I = 75% *well differentiated* (terdiferensiasi baik), stadium II = 50% *moderately differentiated* (terdiferensiasi sedang), stadium III = 75% *poorly differentiated* (terdiferensiasi jelek) dan stadium IV = *undifferentiated* (tidak terdiferensiasi). Sedangkan menurut Sukardja (1996) derajat diferensiasi sel dibagi menjadi 4 derajat yaitu *Grade 1* = diferensiasi baik, *Grade 2* = diferensiasi sedang, *Grade 3* = diferensiasi jelek dan *Grade 4* = tanpa diferensiasi atau anaplastik. Mengetahui derajat diferensiasi sel penting karena umumnya keganasan tumor sesuai dengan derajat diferensiasi sel. Makin jelek derajat diferensiasi selnya makin ganas kanker tersebut (Sukardja, 1996), namun dengan kemajuan teknologi rekayasa genetik saat ini, jawaban hasil pemeriksaan HPA KSSRM tidaklah cukup dengan derajat diferensiasi HPA saja melainkan juga



diperlukan informasi mengenai status *plndy*, sel kinetik, ekspresi onkogen dan mutasi GST tertentu seperti p53 (Manuaba dan Wibawa, 1996).

Penelitian mengenai hubungan gambaran histopatologis KSSRM dengan kejadian mutasi pada GST p53 dan p16 cenderung meningkat yaitu dengan menggunakan parameter diferensiasi sel baik dan jelek (Tsai *et al.*, 2001)

#### **2.4 Diagnosis Pasti Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut**

Menurut peneliti Ramli pada tahun 1995, diagnosis pasti ditentukan berdasarkan pemeriksaan HPA yang didapat melalui eksisional biopsi dan insisional biopsi. Eksisional biopsi dilakukan pada tumor yang masih kecil atau pada kasus yang dapat dilakukan pembedahan atau operabel disertai pemeriksaan potong beku secara mikroskopik untuk memeriksa tepi sayatan biopsi apakah sudah bebas dari tumor atau belum, sedangkan insisional biopsi dilakukan pada kasus-kasus yang sudah tidak dapat dilakukan operasi atau inoperabel pada tepi sayatan pembedahan dan tidak menjamin untuk tidak terjadinya rekurensi walaupun sudah dinyatakan bebas dari tumor ganas secara mikroskopik (Ramli, 1995).

Diagnosis pasti yang hanya berdasarkan pemeriksaan klinis dan HPA saja dapat menimbulkan kesalahan dalam menentukan stadium keganasan dan terapi sehingga diperlukan perubahan pendekatan diagnosis baru KSSRM dengan pendekatan pemahaman biologi molekuler (Todd *et al.*, 1997).

Pendekatan diagnosis molekuler telah dimulai pada 40.000 penduduk Amerika dan 350.000 penduduk berbagai negara di seluruh dunia setiap tahunnya sebagai salah satu upaya tindakan preventif dan pengobatan KRM serta pemahaman mekanisme karsinogenik atau dasar genetik KRM (Todd *et al.*, 1997).

Disamping itu penelitian-penelitian saat ini mulai banyak difokuskan pada diagnosis kanker berdasarkan adanya perubahan molekuler gen-gen pengatur pada fase G1 siklus sel kanker melalui berbagai jalur mekanisme yang menunjukkan adanya mutasi gen yang spesifik yang berperan terhadap pengendalian laju proliferasi sel tidak terkendali sebagai penyebab terjadinya KSSRM, sehingga kebutuhan adanya diagnosis dan indikator prognosis baru merupakan faktor penting untuk memantau tingkat keganasan baik pada stadium dini maupun stadium lanjut KSSRM (Todd *et al.*, 1997; Williams, 2000).

## 2.5 Prognosis dan Terapi Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut

Prognosis dan strategi penanganan terapi KSSRM masih banyak ditentukan oleh diagnosis klinis dan histopatologis yaitu memakai derajat keganasan baik, sedang, jelek, tanpa diferensiasi dan stadium kanker. Penentuan stadium kanker untuk mengetahui pertumbuhan kanker memakai stadium menurut sistem tumor primer (T), nodus regional (N) yaitu kelenjar getah bening (KGB) regional, metastase jauh (M) yaitu metastase di organ jauh yaitu diluar KGB regional yang disingkat dengan sistem TNM. Penentuan sistem TNM dari *Union Internationale Contre le Cancer (UICC)* untuk menentukan stadium tumor yaitu Stadium 0 = Tis No Mo, Stadium I = T<sub>1</sub>NoMo, Stadium II = T<sub>2</sub>NoMo, Stadium III = T<sub>1</sub>NoMo, T<sub>1</sub>N<sub>1</sub>Mo, T<sub>2</sub>N<sub>1</sub>Mo, T<sub>3</sub>N<sub>1</sub>Mo, Stadium IV = T<sub>1</sub>NoN<sub>1</sub>Mo, Tiap T, N<sub>2</sub> N<sub>3</sub>Mo dan Tiap T, Tiap N, M<sub>1</sub>

Keterangan mengenai arti T : tumor primer, untuk melukiskan luas invasi tumor primer maka T diberi indeks angka 0, 1, 2, 3 dan 4, T<sub>0</sub> - tidak ditemukannya tumor primer, Tis = kanker in situ, T<sub>1</sub> = tumor dengan diameter < 2 cm, T<sub>2</sub> = tumor dengan diameter 2 – 4 cm, T<sub>3</sub> = tumor dengan diameter > 4 cm,

T4 - tumor > 4cm dengan infiltrasi ke tulang dan jaringan lunak sekitarnya, Tx = tumor tak dapat ditentukan, kemudian N = nodus regional untuk melukiskan ada tidaknya metastase di KGB; N<sub>0</sub> = tidak didapatkan metastase KGB regional; N<sub>1</sub> = metastase KGB regional makin luas, satu nodus, ipsilateral, diameter ≤ 3 cm; N<sub>2</sub> = metastase KGB regional makin luas, multipel nodus, ipsilateral, diameter 3 cm - ≤ 6 cm; N<sub>3</sub> = metastase KGB regional makin luas, multipel nodus, bilateral, diameter ≤ 6 cm, sedangkan M = metastase jauh yang diberi indeks 0 dan 1 maka M<sub>0</sub> = tidak didapatkan metastase jauh, M<sub>1</sub> = ada metastase jauh. Metastase jauh dapat ke visceral seperti otak, paru, hati, ginjal, tulang dan sumsum tulang serta ke jaringan lunak yang letaknya jauh dari tumor primernya (Sukardja, 1996).

Terapi utama KSRRM pada umumnya pembedahan tergantung pada stadium kanker yang masih lokal disertai ada tidaknya metastase KGB regional dan biasanya dilaksanakan pada stadium I yaitu pembedahan pada kasus belum ditemukan adanya metastase KGB regional (N<sub>0</sub>) namun pembedahan dengan pemeriksaan potong beku tidak menjamin adanya bebas tumor karena sering timbul rekurensi lokal, sehingga mengakibatkan angka rekurensi lebih tinggi, prognosusnya lebih buruk dan dianjurkan terapi radiasi setelah pembedahan (Ramli, 1995).

Menurut Soebandiri (1995), kemungkinan rekurensi tergantung kepada derajat keganasan tumornya dan trans-seksi jaringan yang mengandung tumor pada waktu operasi. Karsinoma dengan derajat keganasan tinggi misalnya *poorly differentiated* atau *undifferentiated* sering tidak terdeteksi pada waktu operasi karena tumor masih nampak kecil sehingga operasinya kelihatan sudah radikal atau berhasil

namun terjadi kegagalan. Keadaan ini ditunjukkan dengan adanya rekurensi kembali tumor tersebut karena sudah ada mikrometastase jauh (Soebandiri, 1995).

Kegagalan terapi kanker terutama disebabkan oleh adanya pembentukan metastase. Pembedahan terhadap tumor ganas yang belum menampakkan penyebarannya sering menemui kegagalan yang ditunjukkan dengan kembuhnya (rekurensi) kembali penyakit tersebut. Terjadinya kekambuhan sebenarnya tumor telah membentuk anak sebar tetapi ukurannya masih terlalu kecil sehingga tidak terdeteksi (Suryohudoyo, 2000).

## 2.6 Dasar Molekuler Karsinogenesis

### 2.6.1 Karsinogenesis

Karsinogenesis dapat didefinisikan sebagai suatu proses perkembangan keganasan yang ditandai dengan adanya transformasi sel normal mulai dari tahap inisiasi dan promosi sampai pada tahap progresi yang terjadi setelah proses keganasan terbentuk. Tahap progresi yang ditunjukkan pada penelitian binatang coba yaitu dengan adanya dediferensiasi sel, pertumbuhan sel yang otonom dan menunjukkan progresivitas tumor (King, 1996). Pada saat ini karsinogenesis banyak dikorelasikan dengan perubahan histopatologis sebelum terjadinya kanker yaitu kelainan pra ganas pada penderita dengan faktor resiko terjadinya kanker serta gambaran klinis pra ganas seperti penderita displasia serviks, polip usus, sirosis hati dengan nodul hiperplastik sebagai akumulasi suatu perubahan genetik sel somatik yang multistep meliputi tahap inisiasi, promosi dan progresi (Putzai *et al.*, 1996). Namun dalam perkembangan di bidang biologi molekuler dan ditunjang oleh teknik rekayasa genetik yang sangat pesat saat ini telah menghasilkan pemahaman yang lebih mendalam tentang dasar patogenesis molekuler penyakit kanker sehingga



menuntaskan kontroversi mengenai kanker timbul karena gangguan genetik atau diluar gangguan genetik dan sudah dapat dibuktikan secara pasti bahwa kanker memiliki dasar genetik (Suryohudoyo, 2000).

### 2.6.2 Ciri umum sel kanker

Sel kanker menunjukkan ciri yang berbeda dengan sel normal dan dapat berproliferasi secara tidak terkendali sedangkan sebaliknya proliferasi sel normal terkendali hanya terjadi jika diperlukan untuk menggantikan sel yang telah aus atau telah mengalami kematian sel dan dipacu oleh faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh sel lain. Pada sel kanker terjadi mekanisme otokrin yaitu sel menghasilkan faktor pertumbuhannya sendiri sehingga proliferasinya tidak terkendali. Morfologi sel kanker berbeda dengan sel normal yaitu berkaitan dengan kecepatan pertumbuhan tumor. Pada tumor yang tumbuh lambat seperti tumor jinak menunjukkan morfologi sel yang normal atau hampir normal namun pada sel kanker dapat mengadakan pertumbuhan yang cepat dan morfologinya sangat berbeda dari sel normal sehingga mirip dengan sel yang belum terdiferensiasi. Pertumbuhan yang cepat dari sel kanker ini dapat menjelaskan bahwa sel kanker hampir seluruhnya terdiri dari inti sel dan hanya sedikit mengandung sitoplasma. Disamping itu perubahan morfologi sel kanker terjadi karena efek pleiomorfik faktor transkripsi yang selain mempengaruhi transkripsi gen-gen yang terlibat dalam replikasi sel juga mempengaruhi gen-gen lainnya (Suryohudoyo, 2000).

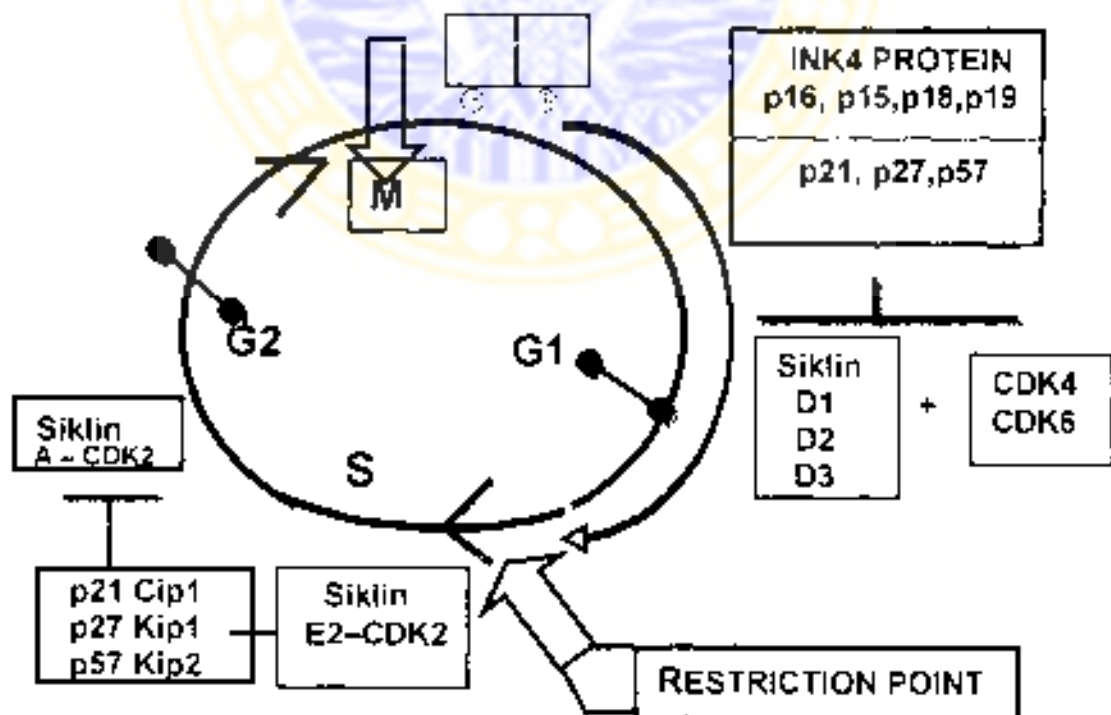
### 2.6.3 Siklus sel kanker

Pada kondisi normal terjadi proses pengaturan molekuler siklus sel normal secara ketat antara aktivasi molekul pengatur positif dan inaktivasi molekul pengatur negatif pada fase *gap 1* (G1) siklus sel terutama pada pengendalian titik restriksi

(*Restriction Point Control*) sehingga sel dapat masuk ke fase sintesa DNA (fase S) dan fase mitosis (fase M) untuk melakukan aktivitas pembelahan sel, diferensiasi dan proliferasi sel yang diperlukan untuk mengganti sel-sel yang sudah rusak (aus) atau sudah mengalami kematian sel sehingga dapat menjaga kelangsungan hidup jaringan atau homeostasis jaringan dalam siklus kehidupan jaringan normal. Pada fase transisi G1/S siklus sel merupakan fase kritis dalam pengendalian molekuler untuk keperluan sintesa DNA yang akan melakukan replikasi DNA dan segregasi kromosom atau pembelahan kromosom menjadi 2 sel anak yang membutuhkan waktu dalam fase pertengahan menuju fase akhir G1. Fase akhir G1 siklus sel merupakan fase sel-sel membuat kesepakatan untuk sel yaitu akan terus mengadakan pembelahan sehingga menuju fase berikutnya atau siklus sel berhenti sementara (*Growth arrest*) yang akan keluar siklus sel dan masuk ke fase G0 untuk memperbaiki DNA yang mengalami kerusakan DNA (*DNA damage*). Sedangkan kemungkinan lainnya adalah terjadi proses penuaan sel atau *senescence* (Grander, 1998) dan selanjutnya jika kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki lagi akibat stimulasi mutagen yang terus menerus tersebut maka sel akan keluar dari siklus sel dan terjadi apoptosis atau program kematian sel (King and Cidlowsky, 1998). Selanjutnya apabila sel yang mengalami kerusakan DNA tersebut tetap tinggal di dalam siklus sel maka akan terjadi mutasi dan ekspresi gen berlebihan yang terus menerus sehingga menyebabkan proliferasi sel tidak terkendali lagi yang cenderung tetap tinggal di dalam siklus sel dan dapat merusak sistem maturasi serta diferensiasi sel. Kemudian sel yang mengalami mutasi tersebut akan keluar dari siklus sel dan dapat merusak pengendali sinyal ekstrasel atau bahkan dapat melakukan program otonom yaitu sel akan menghasilkan

faktor pertumbuhannya sendiri sehingga menyebabkan proliferasi sel tidak terkendali yang diketahui sebagai penyebab kanker (Sherr, 2000, Sandal, 2002).

Pada semua jenis keganasan, gangguan siklus sel yang terdiri dari 4 fase yang berurutan yaitu *Gap 1* (G1), sintesa DNA (S), *Gap 2* (G2) dan mitosis (M) merupakan faktor penting dalam mekanisme patogenesis molekuler kanker terutama pada gen-gen pengatur siklus sel pada fase transisi G1-S. Mekanisme pengaturan molekuler siklus pembelahan sel melibatkan banyak gen-gen pengatur positif dan negatif yang terjadi pada fase progresi G1 siklus sel (Sherr and Roberts, 1999). Sedangkan peneliti Sherr pada tahun 2000 menyatakan bahwa mekanisme pengaturan molekuler siklus sel terjadi pada fase transisi G1-S sebelumnya disebut sebagai pusat pengendali restriksi atau *restriction point control* siklus sel yang pertama kali ditemukan oleh Arthur Pardee (Sherr, 2000), seperti dapat dilihat pada Gambar 2.1



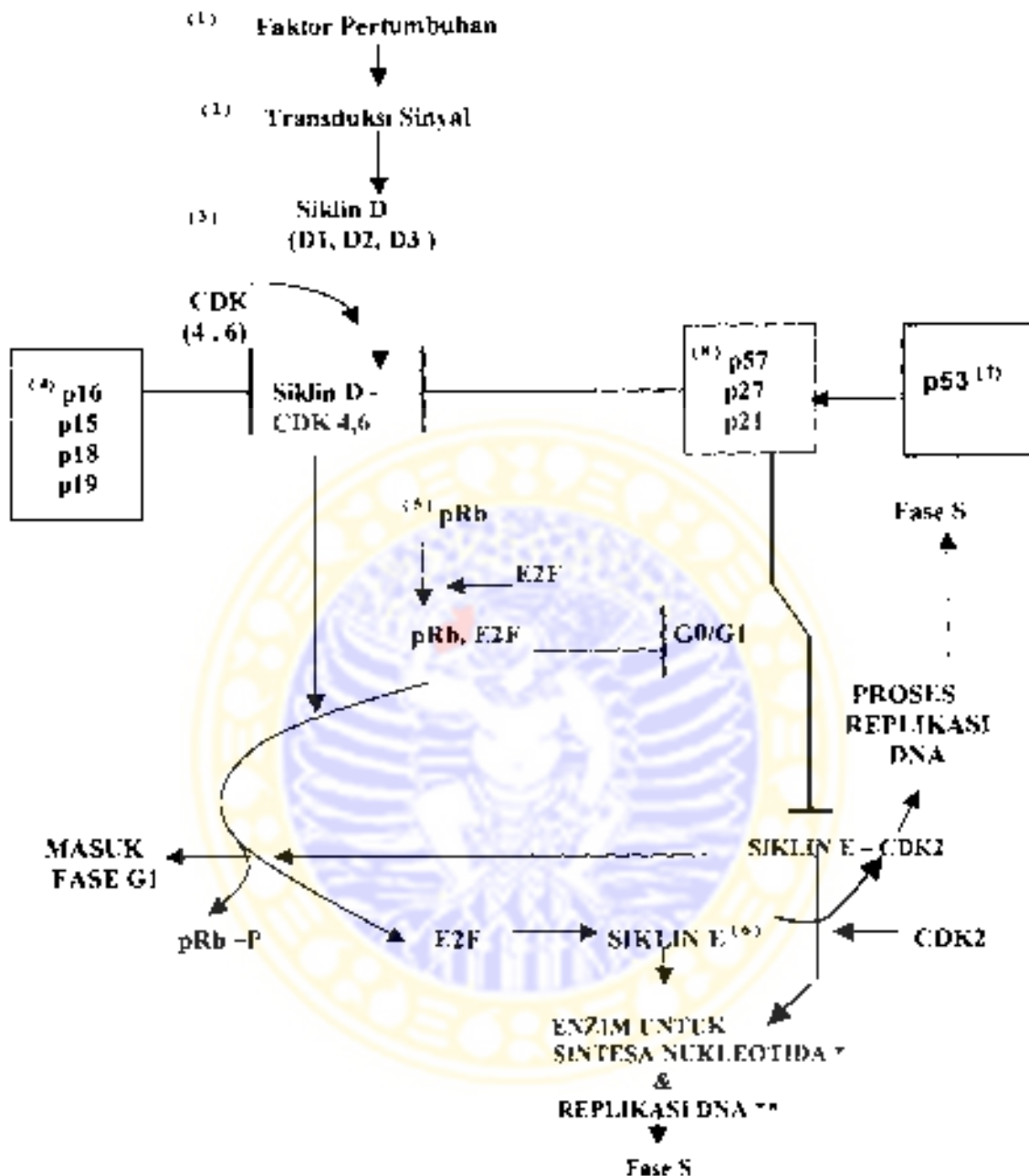
Gambar 2.1 Pengaturan molekuler siklus sel kanker fase G1/S (Sherr, 2000)

#### 2.6.4 Gen-gen pengatur siklus sel kanker

Adanya gangguan pada pengaturan siklus sel normal tersebut berupa sinyal ekstraseluler atau stimulasi mutagen pada ligan ekstrasel seperti reseptor faktor pertumbuhan, matriks protein, molekul adesi dan sebagainya, akan memicu faktor pertumbuhan untuk mengaktifasi transduksi sinyal faktor pertumbuhan. Selanjutnya dapat mengakibatkan perubahan transformasi genetik pada jalur transduksi sinyal melalui aktivasi proto-onkogen fase G1 siklus sel yang terdiri dari komponen molekuler gen-gen pengatur positif pada jalur Rb yaitu siklin D (D1, D2 dan D3) terutama siklin D1 yang berpasangan dengan *cyclin dependent kinase* 4 dan 6 (CDK 4, 6) sehingga terbentuk ikatan kompleks siklin D1 dan CDK4, 6. Kemudian jika stimulasi mutagen berlangsung terus menerus maka akan terjadi ekspresi gen berlebihan terutama siklin D1 dan CDK 4, 6 yang akan memicu komponen molekuler gen-gen pengatur negatif pada fase G1 yang terdiri dari kelompok *cyclin dependent kinase inhibitor* (CKI) yaitu kelompok INK4a yang terdiri dari gen p16, p15, p18 dan p19 dan kelompok CIP1/KIP1 terdiri dari gen p21, p27 dan p57 terutama untuk menghambat ekspresi berlebihan siklin D1 dan CDK4, 6 tersebut. Disamping itu adanya ekspresi berlebihan ikatan kompleks siklin D1 dan CDK4, 6 akan dihambat pula oleh komponen molekuler gen-gen pengatur pada jalur p53 terutama gen p53 baik secara langsung maupun tidak langsung melalui aktivitas p21 WAF1/CIP1 serta akan memicu pRb dan E2F sehingga terbentuk ikatan pRb dan E2F pada fase G0/G1. Pada keadaan normal pRb akan mengadakan fosforilasi (pRb-P) dan E2F akan memicu aktivitas siklin E dan CDK2 pada fase G1 siklus sel sehingga aktivitas fosforilasi pRb menjadi sempurna yang selanjutnya akan memicu proses replikasi DNA (*DNA replication machinery*) untuk memasuki fase S. Apabila



terjadi ekspresi berlebihan siklin E dan CDK2 akibat adanya stimulasi mutagen yang terus menerus maka akan terjadi hiperfosforilasi pRb dan E2F yang akan menghambat laju siklus sel pada fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> menuju fase S sehingga diperlukan aktivitas komponen molekuler gen-gen pengatur negatif yaitu p21, p27 dan p57 untuk menghambat ekspresi berlebihan siklin E dan CDK2. Disamping itu E2F akan memicu enzim-enzim yang diperlukan untuk sintesa nukleotida seperti enzim *dihydrofolate reductase* (DHFR), *thymidine kinase* (TK), *thymidilate synthase* (TS) dan untuk replikasi DNA yaitu *DNA polymerase  $\alpha$*  (POL $\alpha$ ) sehingga sel dapat memasuki fase S. Adanya stimulasi mutagen yang terus menerus pada komponen molekuler gen-gen pengatur pada siklus sel terutama pada fase G<sub>1</sub> tersebut akan menyebabkan kerusakan DNA yang berat dan akan mengakibatkan proliferasi tidak terkendali dan terjadi mekanisme otokrin yaitu sel akan menghasilkan faktor pertumbuhannya sendiri atau terjadi ekspresi faktor pertumbuhan otokrin, aktivasi mutasi molekul transduksi sinyal faktor pertumbuhan, ekspresi berlebihan onkogen dan inaktivasi mutasi GST. Selanjutnya gen-gen pengatur siklus sel yang berperan penting dan langsung dalam perkembangan keganasan terutama pada fase transisi G<sub>1</sub> menuju fase S seperti gen p53, p21, pRb, p16, dan p27 akan mentransformasikan perubahan molekuler dari fase G<sub>1</sub> ke fase S sehingga menyebabkan proliferasi sel tak terkendali dan inaktivasi mutasi gen spesifik yang diketahui sebagai penyebab berbagai keganasan (Grander, 1998; Sherr, 2000), seperti terlihat pada Gambar 2.2



Keterangan → Stimulasi, — Inhibitor

\* DHFR ( *Dihydrofolate Reductase* )

\* TK ( *Thymidine Kinase* )

\* TS ( *Thymidilate Synthase* )

(1) Ekspresi onkogen, (2) Mutasi aktivasi molekul-molekul transduksi sinyal faktor pertumbuhan,

(3) Ekspresi berlebihan, (4) Mutasi inaktivasi, (5) Mutasi inaktivasi,

(6) Ekspresi berlebihan, (7) Mutasi inaktivasi, (8) Mutasi inaktivasi

Gambar 2.2 Kanker disebabkan adanya mutasi pada gen-gen pengatur siklus sel kanker terutama pada fase G1/S (Sherr, 1996)

### 2.6.5 Jalur p53 dan jalur Rb

Jalur p53 adalah jalur yang melibatkan komponen p53 dan p21, MDM2, Bax dan KILLER DR5 yang berperan penting dalam pengendalian siklus sel dan dapat menghambat laju proliferasi sel serta memicu apoptosis baik pada fase transisi G1/S maupun fase G2/M siklus sel. Beberapa peneliti menekankan pentingnya jalur p53 sebagai suatu jalur yang melibatkan peran gen-gen pengatur molekul dalam patogenesis molekuler pada berbagai kanker yaitu melalui inaktivasi GST p53 yang berperan secara langsung maupun tidak langsung dalam pengendalian siklus sel terutama pada fase transisi G1/S (Weiss, 2000; Sandal, 2002).

Jalur Rb yaitu suatu jalur yang melibatkan komponen molekuler positif dan negatif dalam siklus sel yaitu siklin D, *Cyclin Dependent Kinases* (CDK), *Cyclin Dependent kinase inhibitor* (CDKI), pRb dan E2F mempunyai fungsi sebagai pengendali laju siklus sel atau pengaturan molekuler terutama pada fase G1 siklus sel dan diferensiasi sel serta sering menjadi sasaran penelitian dalam memahami perubahan molekuler yang terjadi pada berbagai keganasan manusia (Bartek *et al.*, 1996, Adam and Kaelin, 1998; Harbour and Dean, 2000). Sedangkan komponen molekuler pengatur siklus sel yang berperan penting pada jalur Rb dan yang sering mengalami mutasi terbanyak setelah gen p53 adalah komponen GST p16 pada berbagai keganasan sebagai respons terhadap adanya sinyal mutagen (Sherr, 1996). Mutasi pada gen Rb tidak membutuhkan waktu yang cukup lama untuk menghambat aktivitas fungsi E2F sehingga dalam perkembangan keganasan yang terjadi adalah dominan fenotip maka ke dua alel menunjukkan mutasi delesi homozigot atau *Loss of function* Rb (Sandal, 2002).

Penelitian mengenai mekanisme patogenesis molekuler kanker baik *in vivo* maupun *in vitro* melalui jalur p53 dan jalur Rb saat ini beserta komponen protein yang terlibat di dalam ke dua jalur tersebut mempunyai peran sangat penting sebagai pengatur molekuler, pengendali laju proliferasi siklus sel dan diferensiasi sel terutama pada fase G1 yang merupakan salah satu faktor utama penyebab keganasan dan sering dipakai sebagai kajian dasar untuk pemahaman mekanisme patogenesis molekuler pada berbagai kanker (Mc Doniels-Silvers *et al.*, 2001). Komponen molekuler yang berperan penting pada siklus sel pada jalur p53 yaitu p53 dan p21 (Sherr, 1998; Sandal, 2002), sedangkan pada jalur Rb yaitu p16, pRb, dan p27 (Sherr, 2000; Tsuda *et al.*, 2000). Namun masih banyak kontroversi mengenai komponen molekuler jalur p53 dan jalur Rb yang paling berperan penting dalam pengendalian siklus sel sebagai penyebab berbagai keganasan (Sandal, 2002).

#### 2.6.6 Onkogen dan gen supresor tumor

Penemuan onkogen dan gen supresor tumor diawali tahun 1990 telah memberikan data baru bagi peneliti dan klinikus dalam menentukan perkembangan dan progresivitas kanker di bidang biologi molekuler (Putzai *et al.*, 1996). Mekanisme aktivasi onkogen dan inaktivasi gen supresor tumor merupakan dasar perubahan genetik yang penting pada siklus pembelahan sel karsinoma sel skuamosa pada umumnya (Nakagawa *et al.*, 1995). Adanya mekanisme tersebut merupakan faktor penting pengaturan molekuler untuk proses fisiologi normal maupun adanya mutasi pada tahap proliferasi, diferensiasi, *senescence* dan apoptosis sehingga mengakibatkan deregulasi di dalam sel kanker (Grandor, 1998).

Onkogen adalah gen yang dapat menimbulkan kanker. Kebanyakan onkogen adalah bentuk mutan dari gen – gen normal (proto-onkogen) yang terlibat



dalam pengendalian pertumbuhan dan pembelahan sel, sedangkan proto-onkogen adalah gen-gen yang menyandi faktor pertumbuhan atau protein-protein yang menyandi transduksi sinyal faktor pertumbuhan sehingga memicu proliferasi sel. Proto-onkogen dapat mengalami mutasi dan berubah menjadi onkogen sehingga onkogen yang telah teraktivasi tanpa memerlukan pakuhan dari faktor pertumbuhan. Mutasi pada proto-onkogen yang menimbulkan onkogen tersebut dapat menyebabkan peningkatan fungsi sehingga disebut mutasi peningkatan fungsi (*gain of function mutation*), karena efek onkogen bersifat dominan yaitu mutasi cukup pada salah satu dari ke dua alela untuk dapat menimbulkan efek (Suryohudoyo, 2000). Beberapa peneliti melaporkan bahwa onkogen sendiri tidak cukup untuk mentransformasikan suatu keadaan normal menjadi suatu keganasan namun dengan temuan onkogen sudah dapat mencerminkan adanya faktor pemicu penting untuk terjadinya keganasan (Bishop, 1991; Sidransky, 1995).

Gen supresor tumor adalah gen yang menyandi protein baik secara langsung maupun tak langsung menghambat laju siklus sel atau mengadakan modulasi pada jalur transduksi sinyal negatif dan berfungsi sebagai sistem pengendalian serta keseimbangan untuk meniadakan stimulus atau stressor dari luar maupun di dalam nukleus yang dapat menyebabkan adanya perubahan genetik (Todd *et al.*, 1997; Lodish *et al.*, 2000). Mutasi pada GST merupakan mutasi penghilang fungsi (*Loss of function mutation*) sehingga ciri umum suatu GST adalah bahwa kanker hanya muncul bila ke dua alela GST mengalami inaktivasi sehingga mutasinya bersifat resesif (Suryohudoyo, 2000).

Kanker juga dapat timbul karena ekspresi berlebihan produk proto-onkogen normal. Hal ini dapat terjadi karena berbagai sebab seperti peristiwa

amplifikasi (penggandaan) proto-onkogen atau karena aktivasi proto-onkogen yang semula tidak aktif (Suryohudoyo, 2000).

Mekanisme aktivasi molekul pengatur positif dan inaktivasi molekul pengatur negatif pada fase G1 siklus sel akan menyebabkan fosforilasi protein retinoblastoma (pRb) melalui mekanisme interaksi yang berbeda pada molekul pengatur fase G1 (Lundberg *and* Weinberg, 1998). Identifikasi adanya aktivasi onkogen dan inaktivasi GST secara *in vivo* tidak mudah mengingat adanya mekanisme interaksi ikatan kompleks antara siklin D terutama siklin D1 dengan CDK4, 6 yang dikontrol oleh CDKI terutama GST p16 INK4a yang menghambat secara spesifik dan berperan penting dalam mengendalikan adanya ekspresi berlebihan siklin D1 dan CDK4, 6 sehingga mengakibatkan stabilitas fosforilasi pRb pada fase G1 terutama pada fase transisi G1 menuju fase S untuk melakukan sintesa DNA agar siklus pembelahan sel berjalan secara normal. Sedangkan mekanisme lainnya yang ikut berperan terhadap stabilitas fosforilasi pRb yaitu adanya ikatan siklin E dan CDK2, namun sampai saat ini mekanisme patogenesis molekulnya belum diketahui secara jelas (Konstantinidis *et al.*, 1998).

### 2.6.7 Mutasi gen

Mutasi gen adalah suatu perubahan urutan nukleotida yang menyusun suatu rantai DNA, dapat mengakibatkan hilangnya gen yang menyandi protein atau terjadi perubahan struktur protein sedangkan mutasi pada organisme disebut mutan (Lodish *et al.*, 2000).

Mutasi pada tingkat DNA, dapat melibatkan penggantian satu pasang atau lebih basa nukleotida disebut sebagai mutasi noktah (*point mutation*). Sedangkan penggantian satu pasang basa nukleotida ini dapat dibagi dua yaitu dalam bentuk

transisi dan tranversi. Transisi terjadi jika pengantian satu basa nukleotida diganti oleh basa lainnya dalam struktur kimia yang sama misalnya basa purin diganti basa purin ( $A \leftrightarrow G$ ) atau basa pirimidin diganti dengan basa pirimidin ( $T \leftrightarrow C$ ). Sedangkan sebaliknya transversi adalah penggantian basa purin dengan basa pirimidin ( $A \leftrightarrow T$ ) atau basa pirimidin diganti dengan basa purin ( $G \leftrightarrow C$ ). Mutasi pada tingkat DNA lainnya adalah insersi atau delesi yaitu penambahan atau penghilangan satu pasang basa DNA sedangkan mutasi inversi adalah penghilangan bagian heliks ganda DNA yang diikuti dengan insersi pada posisi yang sama tetapi orientasinya terbalik misalnya C:G menjadi G:C atau A:T menjadi T:A (Brown, 1989).

Mutasi pada tingkat gen dapat berupa *silent mutation*, *missense mutation*, *nonsense mutation* dan *frameshift mutation*. Peneliti Brown (1989) menyatakan bahwa *silent mutation* merupakan suatu mutasi noktah yang terjadi pada nukleotida ketiga suatu kodon sehingga merubah kodon tetapi tidak merubah kode asam amino sehingga walaupun genotipnya berubah namun fenotipnya tetap sama, seperti terlihat pada Gambar 2.3

	1	4	7	10	13	16	19
	ATG	GGA	GCT	CTA	TTA	ACC	TAA
Asam amino	Met	Gly	Ala	leu	Leu	Thr	'stop'
					↓		
Sekuen mutasi	ATG	GGA	GCT	CTA	TTG	ACC	TAA
					Leu		

Gambar 2.3 *Silent mutation* kodon ke 5 TTA yaitu leusin berubah menjadi TTG namun tidak merubah asam amino yang dihasilkan yaitu tetap leusin (Brown, 1989).

Bentuk mutasi *missense* adalah perubahan satu pasang basa nukleotida yang di substitusi oleh satu pasang basa lainnya (Lodish *et al.*, 2000). Mutasi gen ini dapat menghasilkan perubahan asam amino suatu protein yang disandi oleh gen sehingga akan merubah fenotip pada tingkat seluler, seperti terlihat pada Gambar 2.4

Sekuen <i>Wild Type</i>						
Asam Amino	N-Phe	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C
DNA	3'-AAA	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5-TTT	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
		▼				
<i>Missense mutation</i>	3'-AAT	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5-TTA	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
	N-Leu	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C

Gambar 2.4 Mutasi *missense* terjadi pada kodon pertama, urutan basa ke-3 sehingga terjadi perubahan asam amino dari penilalanin menjadi leusin (Lodish *et al.*, 2000).

Bentuk mutasi *nonsense* adalah perubahan satu pasang basa nukleotida yang berupa stop kodon menggantikan suatu kodon asam amino sehingga menunjukkan terminasi prematur suatu translasi protein, seperti terlihat pada Gambar 2.5 sedangkan pembentukan protein yang terhenti ini dapat menyebabkan gangguan fungsi gen dan perubahan fenotip mutan (Lodish *et al.*, 2000).

Sekuen <i>Wild Type</i>						
Asam Amino	N-Phe	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C
DNA	3'-AAA	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5-TTT	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
			↓			
<i>Nonsense mutation</i>	3'-AAA	GCT	ATC	TAT	CGG	TTA-5'
	5-TTT	CGA	TAG	ATA	GCC	AAT-3'
	N-Phe	Arg	'stop'			

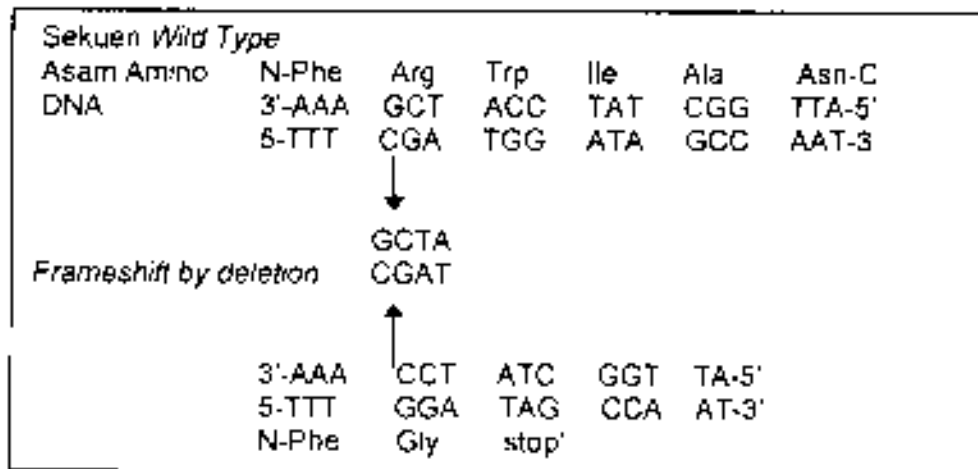
Gambar 2.5 Mutasi *nonsense* terjadi pada kodon ketiga, urutan basa ke - 8 menyebabkan terbentuknya kodon terminasi TAG sehingga pembentukan asam amino terhenti (Lodish *et al.*, 2000).



Bentuk mutasi *frameshift* adalah perubahan satu pasang basa nukleotida yang menyebabkan terjadinya insersi (*frameshift by addition*) dan delesi (*frameshift by deletion*) sehingga terjadi perubahan kerangka pembacaan kodon setelah bagian yang termutasi mengalami perubahan atau pergeseran total pembacaan kodon. Adanya penambahan atau insersi pada basa T kodon 4, urutan ke-10 akan menyebabkan perubahan pembacaan kodon sehingga susunan asam amino juga ikut berubah (seperti terlihat pada Gambar 2.6), sedangkan delesi terjadi yaitu penghilangan pada kodon 2 pada basa GCT yang berpasangan dengan CGA dan kodon 3 pada basa A yang berpasangan dengan T sehingga pembacaan kodon juga ikut bergeser. *Frameshift mutation* ini selalu menghasilkan fenotip mutan (Brown, 1989; Lodish *et al.*, 2000), seperti terlihat pada Gambar 2.7

<b>Sekuen Wild Type</b>						
Asam Amino	N-Phe	Arg	Trp	Ile	Ala	Asn-C
DNA	3'-AAA	GCT	ACC	TAT	CGG	TTA-5'
	5'-TTT	CGA	TGG	ATA	GCC	AAT-3'
<b>Frameshift by addition</b>						
	3'-AAA	GCT	ACC	ATA	TCG	GTT A-5'
	5'-TTT	CGA	TGG	TAT	AGC	CAA T-3'
	N-Phe	Arg	Trp	Tyr	Ser	Gln

Gambar 2.6 Mutasi *frameshift by addition* yaitu penambahan basa yang menyebabkan insersi pada basa T kodon 4 urutan ke-10 sehingga asam amino yang dihasilkan sangat berbeda (Lodish *et al.*, 2000).



Gambar 2.7 Mutasi *frameshift by deletion* menyebabkan delesi pada sekuen pasang basa pasang basa GCTA dan CGAT sehingga terjadi perubahan asam amino yang sangat berbeda (Modish *et al.*, 2000)

## 2.7 Perkembangan Teknik Biologi Molekuler

### 2.7.1 *Polymerase chain reaction* (PCR)

*Polymerase chain reaction* (PCR) merupakan suatu metode enzimatik *in vitro* yang dipergunakan untuk menghasilkan gugus DNA yang spesifik dalam jumlah besar dan waktu singkat. Metode PCR ditemukan Karel Mullis pertama kali pada tahun 1985 dan telah menghasilkan penelitian dan pengembangan dalam bidang kesehatan dan kedokteran untuk memahami berbagai patogenesis maupun diagnosis penyakit (Mullis, 1985).

Teknologi ini berkembang dari konsep replikasi DNA yaitu target DNA yang spesifik akan digunakan sebagai *template* (cetakan) dan akan diperbanyak (amplifikasi) secara *in vitro* dengan menggunakan enzim DNA polimerase melalui proses denaturasi yaitu dua oligonukleotida yang berfungsi sebagai primer akan menempel pada proses *annealing* pada ke dua pita DNA komplementer. Selanjutnya dilakukan tahap ekstensi pada berbagai suhu yang berbeda secara simultan dalam

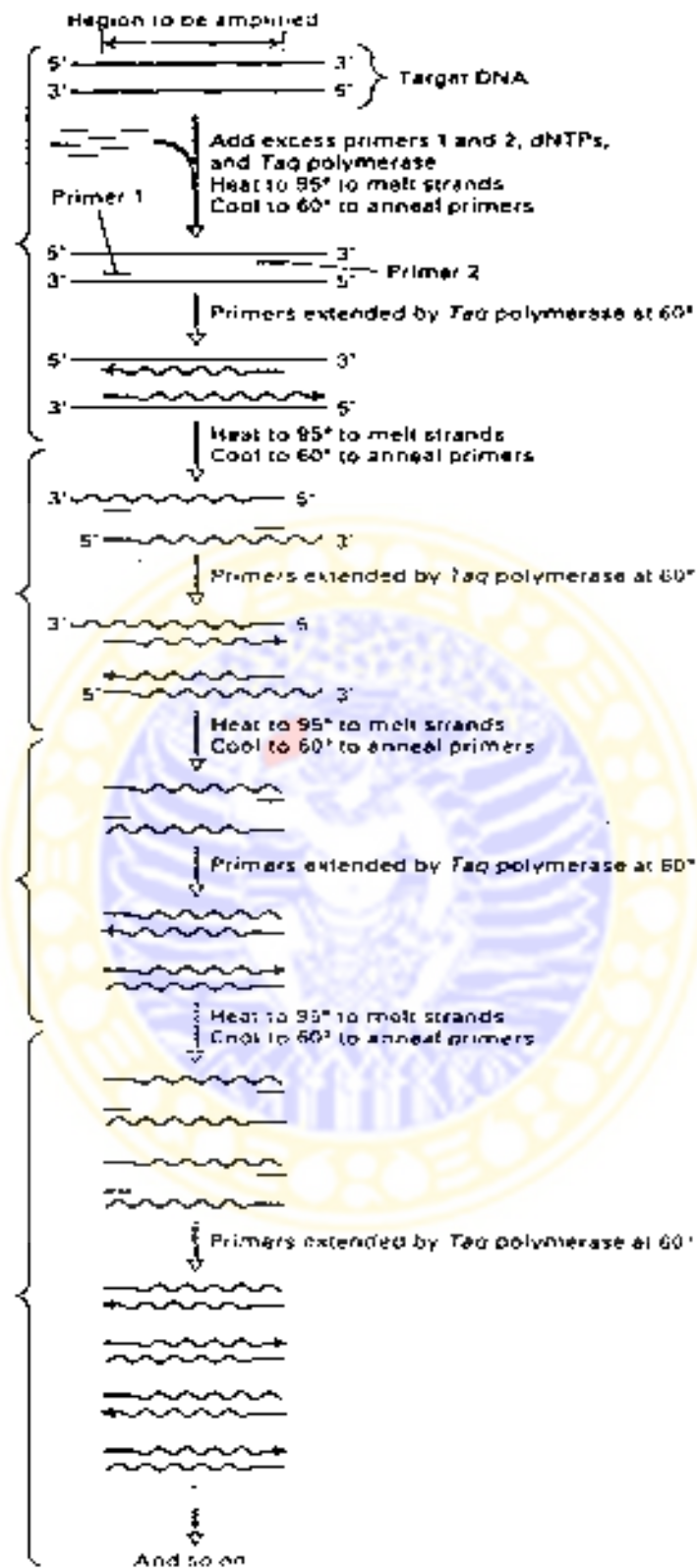
beberapa siklus sehingga diperoleh amplifikasi target DNA spesifik mencapai  $2^n$  (jumlah siklus) *copy* DNA atau dapat mencapai jutaan perbanyakan DNA target dalam beberapa jam (Crowford, 1998).

Protokol standar PCR untuk penggandaan DNA pada umumnya mempunyai prinsip yang sama namun tidak semua protokol dapat berlaku pada semua keadaan dan tempat sehingga diperlukan optimasi PCR sebelum menemukan kondisi protokol PCR yang tepat meliputi persiapan sampel, pemilihan primer, variasi *Taq* DNA polimerase, konsentrasi dioksiribosenukleotida trifosfat, konsentrasi magnesium dan jumlah siklus (Sambrook *et al.*, 1989). Teknik PCR dimulai dengan suatu bahan yang terdiri atas pita ganda DNA (*double stranded DNA*) kemudian sejumlah primer ditambahkan masing-masing dengan sekuen pada salah satu ujung target daerah yang akan diamplifikasi. Disamping itu ditambahkan pula enzim termostabil *Taq* DNA polimerase dan dioksiribosenukleotida trifosfat (dNTPs). Pada siklus pertama dilakukan denaturasi dengan suhu  $95^{\circ}\text{C}$  untuk memisahkan pita ganda DNA kemudian dilakukan pendinginan sampai suhu  $60^{\circ}\text{C}$  (*annealing primer*) sehingga primer 1 dan primer 2 masing-masing mengadakan hibridisasi dengan pasangan komplementernya pada daerah target DNA, selanjutnya ditambahkan *Taq* DNA polimerase pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ . Pada tahap ekstensi masing-masing primer diharapkan tepat pada ujung 3' agar diperoleh panjang dan konsentrasi DNA yang akan diperbanyak. Tahap ekstensi PCR dengan waktu 30 detik pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  sudah cukup menghasilkan 400-500 pasang basa dan ditambah ekstra ekstensi selama 1 menit dapat menghasilkan 2 kb. Analisis hasil PCR dapat digunakan elektroforesa gel dengan menggunakan gel agarosa poliakrilamid sesuai dengan ukuran DNA yang akan dianalisis. Pada waktu

elektroforesis gel PCR diwarnai dengan etidium bromid dan selanjutnya DNA dilihat dengan menggunakan sinar ultra violet, kemudian di foto dengan menggunakan foto polaroid. Prinsip metode PCR (Lodish *et al.*, 2000), seperti dapat dilihat pada Gambar 2.8







Gambar 2.8. Prosedur pemeriksaan PCR (Lodish et al. 2000)

### 2.7.2 Analisis *single strand conformational polymorphism* (SSCP)

*Single strand conformational polymorphism* (SSCP) merupakan suatu teknik denaturasi DNA pita ganda menjadi DNA pita tunggal yang produknya kemudian dilakukan pemisahan dengan poliakrilamid gel elektroforesis (PAGE), sehingga teknik SSCP merupakan uji skrining untuk analisis perubahan mobilitas DNA atau perbedaan elektromobilitas pita DNA pada elektroforesis karena adanya mutasi atau substitusi nukleotida yang mengakibatkan perubahan konformasi dari DNA pita tunggal. Teknik SSCP dapat digunakan untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi–mutasi noktah dan polimorfisme (Orta *et al* , 1989).

Pada teknik SSCP akan menunjukkan molekul–molekul yang akan terpisah dan migrasinya berdasarkan struktur sekunder pita DNA tunggal akibat adanya mutasi. Pada saat ini telah dikembangkan teknik analisis SSCP non radioaktif untuk mendeteksi adanya mutasi dengan pengecatan etidium bromid atau dengan menggunakan pengecatan perak nitrat. Teknik pengecatan ini memiliki keuntungan antara lain menghilangkan bahaya isotop, prosedur kerja relatif sederhana dan menghasilkan pita DNA yang lebih tajam serta mudah dilakukan analisis (Crawford, 1998).

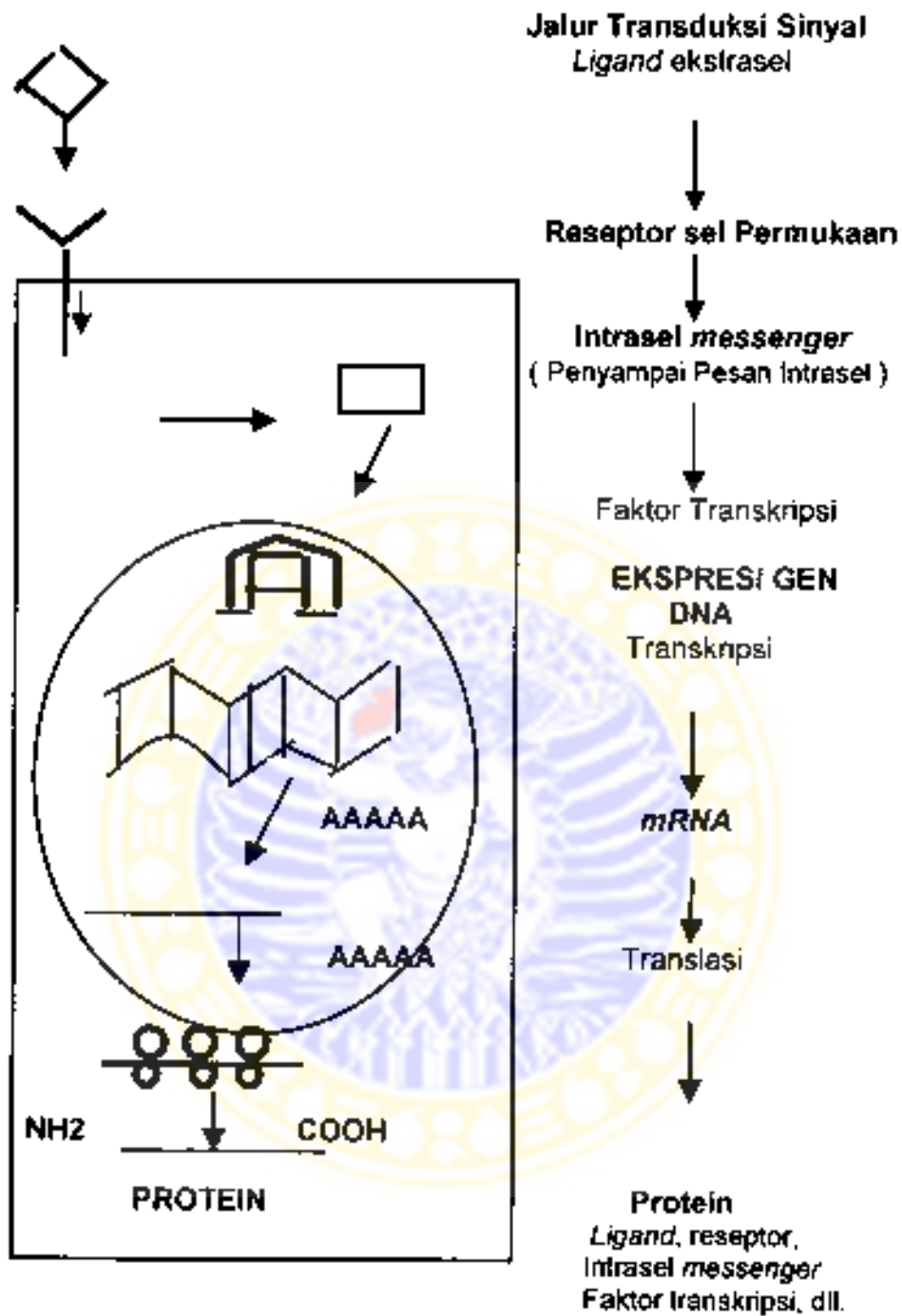
## 2.8 Dasar Molekuler Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut

Peristiwa genetik yang diketahui berperan penting sebagai penyebab terjadinya KSSRM yaitu adanya proses perubahan sitogenetik penyebab deregulasi ekspresi gen, perubahan pada jalur transduksi sinyal, reseptor sel permukaan, intraseluler *messenger* atau pembawa pesan transduksi sinyal, faktor transkripsi, perubahan pengaturan fungsi protein melalui deregulasi ekspresi gen, onkogen dan GST (Todd *et al.*, 1997), dapat dilihat pada Gambar 2.9

Karsinogenesis skuamosa rongga mulut disebabkan adanya akumulasi perubahan gen spesifik melalui suatu proses *multistep, multistruktur* yang melibatkan banyak peristiwa genetik, yang dapat mengubah fungsi aktivasi onkogen dan inaktivasi GST sehingga menghasilkan peningkatan produk faktor pertumbuhan atau reseptor pada permukaan sel, peningkatan sinyal pembawa pesan intrasel dan produk faktor transkripsi (Williams, 2000)

Peningkatan aktivasi onkogen dan inaktivasi GST menunjukkan suatu fenotip sel yang dapat meningkatkan pertumbuhan sel tidak terkendali, terlepas dari jaringan normal sekitarnya dan menghasilkan faktor pertumbuhannya sendiri sehingga proliferasinya tidak terkendali kemudian terjadi sinyal amplifikasi atau mutasi gen yang memicu proses keganasan (Williams, 2000).

Pemahaman mengenai perkembangan tumor atau proses karsinogenesis adalah semacam proses multi step evolusi atau semacam evolusi klonal yang dikenal melalui suatu hipotesis dari Nowell *clonal evolution* (Cornellisse, 1998). Teori evolusi klonal atau teori pukulan berganda ini dapat menjelaskan mengapa kanker lebih sering dijumpai pada usia relatif lanjut karena semakin tua umur seseorang kemungkinan mendapat mutasi berulang-ulang menjadi semakin besar (Suryohudoyo, 2000)



Gambar 2.9 Jalur Transduksi Sinyal (Todd *et al.*, 1997).



Proses keganasan yang terjadi pada rongga mulut ditandai dengan adanya perubahan struktur dan fungsi sel abnormal pada epitel keratinosit rongga mulut sehingga dapat mengadakan invasi lokal pada jaringan normal terdekat maupun metastase jauh (Todd *et al.*, 1997, Williams, 2000)

Menurut Todd *et al.*, (1977) meskipun 6 sampai 10 perubahan genetik molekuler diperlukan untuk terjadinya keganasan pada rongga mulut namun tidak penting untuk melakukan identifikasi seluruh perubahan molekuler sebelum terbukti pengaruh terapi gen dapat direalisasikan. Sehingga yang terpenting adalah bagaimana dapat membuktikan adanya perubahan molekuler melalui mekanisme aktivasi onkogen dan inaktivasi GST yang sampai saat ini belum dapat dipahami secara jelas (Todd *et al.*, 1997). Pada level molekuler, beberapa laporan peneliti menyebutkan bahwa tidak aktifnya GST p53 merupakan faktor utama penyebab KSSRM (Matsumura *et al.*, 1996, Yeudal *et al.*, 1997) yang mempunyai peran langsung dan tidak langsung melalui aktivasi transkripsi gen p21 pada siklus sel terutama pada fase transisi G1/S (Haupt and Oren, 1996, Bartkova *et al.*, 1997). Sedangkan pada jalur sel yang berasal dari karsinoma sel skuamosa ditemukan juga beberapa mutasi gen seperti amplifikasi gen dan delesi di berbagai tempat pada kromosom (Matsumura, 1995).

## 2.9 Deteksi Mutasi Gen

Mutasi gen yang sudah terdeteksi dalam penelitian ini hanya kami fokuskan pada deteksi mutasi gen p53 dan p16 mengingat ke dua GST tersebut merupakan target penelitian terbesar saat ini dan merupakan mutasi yang terbanyak ditemukan pada berbagai keganasan. Data frekuensi mutasi GST pengatur fase G1 siklus sel pada berbagai kanker di seluruh tubuh menunjukkan bahwa gen p53

merupakan GST yang terbanyak mengalami mutasi yaitu rata-rata lebih besar dari 50% yang terletak daerah ekson 5-8 yang disebut *hot spot region* terutama ekson 5 dan 7 pada kanker kolorektal dan laring pada kodon 248, 273 dan 285 (Bosari *et al.*, 1995; Leahy *et al.*, 1996, Zang *et al.*, 2000, Somasundaram and El-Deiry, 2000). Namun ada perbedaan frekuensi mutasi di beberapa lokasi kanker seperti di Cina pada 60 penderita karsinoma sel skuamosa laring ditemukan mutasi pada ekson 5-8 dengan menggunakan *polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) rata-rata 78,8% terbanyak pada ekson 5 (50%) dan ekson 7 (41%) sedangkan ekson 8 (25%) dan ekson 6 (11%), yang mempunyai hubungan dengan faktor karsinogen (Zang *et al.*, 2000). Sedangkan pada kanker karsinoma kepala dan leher di Belanda dijumpai mutasi p53 hampir 100% pada ekson 1 sampai 11 dan paling sering mutasi pada daerah ekson 5-9 serta mempunyai nilai prognosis (Kropveld *et al.*, 1999; Nylander *et al.*, 2000). Peneliti lainnya melaporkan terjadi mutasi delesi p53 pada kanker kepala dan leher di Jerman yang mempunyai hubungan yang signifikan dengan derajat diferensiasinya yaitu dengan diferensiasi baik dan diferensiasi jelek sehingga peningkatan delesi yang terjadi pada derajat diferensiasi jelek diduga mempunyai hubungan dengan progresivitas tumor (Bockmull *et al.*, 1998). Pada kanker esofagus terdapat mutasi p53 di daerah ekson 5-9 sebesar 77% dan terbanyak pada ekson 5 sebanyak 59% di Cina (Hu *et al.*, 2001). Ditaporkan pula mutasi p53 (ekson 5-9) pada kanker esofagus sebesar 44 %, ditemukan mutasi terbanyak pada daerah ekson 7 dan 8 sebanyak 33,3 % di Hongkong, yang tidak mempunyai hubungan dengan parameter gambaran klinis; usia, jenis kelamin, perokok/kebiasaan minum alkohol, lokasi tumor, stadium klinis dan histopatologis; diferensiasi baik dan sedang serta

tidak mempunyai korelasi dengan ekspresi gennya (Lam *et al.*, 1997). Mutasi p53 pada kanker ovarium di Jepang ditemukan sebesar 61% mempunyai korelasi dengan ekspresi berlebihan siklin D1 (Shigemasa *et al.*, 1999). Pada 35 penderita kanker payudara di Cina didapatkan mutasi heterozigot GST p53 dengan metode PCR-SSCP sebesar 17 kasus (49%) dan mempunyai asosiasi yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan diferensiasi jelek (Chen *et al.*, 1995). Sedangkan deteksi mutasi gen p53 pada KSSRM di Inggris dengan menggunakan metode PCR-SSCP didapatkan perbedaan pola migrasi yang menunjukkan adanya mutasi heterozigot sebanyak 15/27 (55%) pada ekson 2-9 (Trivedy *et al.*, 1998) namun mutasi heterozigot GST p53 di India ditemukan sebesar 15% dengan metode *polimerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) yang pada penelitian sebelumnya dilaporkan frekuensi mutasi heterozigot tinggi pada KSSRM di negara Eropa (Kannan *et al.*, 2000). Peneliti lainnya melaporkan bahwa mutasi heterozigot lebih sering terjadi pada GST p53 dan mutasi homozigot lebih banyak terjadi pada GST p16 pada berbagai keganasan di seluruh tubuh (Papp *et al.*, 1997). Pada penderita KSSRM ditemukan mutasi gen p53 pada ekson 5-8 dengan metode *temperatur gradient gel elektroforesis* (TGGE) sebesar 89,5% di Jepang (Kusama *et al.*, 1996) sedangkan mutasi gen p53 dilaporkan sebesar 53% dengan metode PCR/TGGE pada ekson 5-8 mempunyai korelasi dengan faktor etiologi dan prognosis di Jerman (Ostwald *et al.*, 2000). Namun penderita KSSRM dibawah usia 40 tahun tanpa disertai resiko terjadinya kanker rongga mulut, tidak ditemukan mutasi p53 pada ekson 5-9 dan tidak mempunyai korelasi dengan deteksi ekspresi gen p53 sebanyak 83% di Amerika (Lingen *et al.*, 2000) Sedangkan peneliti Kuo *et al.*, (1999) melaporkan mutasi p53 KSSRM jarang terjadi pada ekson 5-9 sebesar

5,4% dan ditemukan mutasi noktah pada kodon 266 di Taiwan. Peneliti Shahnava *et al.*, (2000) melaporkan deteksi mutasi p53 sebanyak 53% sering terjadi pada stadium lanjut dan mempunyai hubungan dengan transformasi fenotip keganasan di Kanada. Sedangkan peneliti lainnya melaporkan kejadian mutasi gen p53 sebesar 51/121 (42%) di Jepang dengan metode PCR-SSCP tidak mempunyai hubungan yang signifikan dengan beberapa parameter gambaran klinikohistopatologis kecuali status TNM terutama penyebaran kelenjar getah bening regional mempunyai hubungan yang signifikan dengan mutasi gen p53 sehingga data penelitian ini menunjukkan adanya mutasi gen p53 yang spesifik dapat merupakan faktor prognosis yang penting bagi penderita KSSRM (Yamazaki *et al.*, 2003). Dilaporkan kejadian mutasi gen p53 KSSRM sebesar 163/383 (42%) pada beberapa negara seperti di negara Eropa, Amerika, Australia, Cina dan Jepang mempunyai hubungan yang signifikan dengan penggunaan tembakau atau perokok sinergi dengan peminum alkohol dan kejadian mutasi gen p53 KSSRM rata – rata sebesar 19,89% di India, Srilanka, Papua Neugini dan Asia Tenggara, penderita KSSRM pengunyah tembakau (penginang) mempunyai hubungan yang signifikan dengan kejadian mutasi gen p53 (Hsieh *et al.*, 2001). Sedangkan di Taiwan mutasi gen p53 sebesar 91/187 (48,66%) tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan gambaran klinis seperti umur, jenis kelamin, stadium klinis, perokok atau pemakan sirih (penginang) kecuali adanya hubungan yang signifikan antara peminum alkohol sebesar 56,44% dan tidak peminum alkohol 39,53% dengan kejadian mutasi p53 ekson 5- 9 dengan  $p=0,02$  (Hsieh *et al.*, 2001). Peneliti lainnya melaporkan kejadian mutasi gen p53 dengan menggunakan PCR-SSCP ditemukan sebesar 40%



mempunyai hubungan signifikan dengan lokasi tumor, konsumsi alkohol dan perokok di Brasil (Chaves *et al.*, 2004).

Frekuensi mutasi GST p16 atau p16 INK4a merupakan GST terbanyak ke dua setelah p53 pada berbagai kanker di seluruh tubuh antara 30-50% yang terletak pada *hot spot region* ekson 1-3 (Sherr, 1996; Liggett and Sidransky, 1998). Namun pada kanker kepala dan leher di Amerika ditemukan inaktivasi GST p16 pada ekson 1, 2 dan 3 berupa delesi homozigot sebesar 67%, metilasi 21%, 1 penderita mengalami *rearrangement* pada lokus p16 dan 1 penderita menunjukkan mutasi *frameshift* (Reed *et al.*, 1996). Pada kanker pankreas dengan metode RT-PCR dan *Western blotting* di Jerman ditemukan mutasi gen p16 sebanyak 56%, sedangkan mutasi p15 sebanyak 52% (Naumann *et al.*, 1996). Sedangkan pada kanker nasofaring ditemukan mutasi gen p16 sebesar 40% (Sherr, 1996) dan kanker laring di Spanyol ditemukan mutasi gen p16 sebanyak 22% yang mempunyai hubungan dengan stadium lanjut (Jares *et al.*, 1997). Pada kanker kepala dan leher di Amerika ditemukan inaktivasi gen p16 disebabkan adanya metilasi, mutasi noktah dan delesi homozigot sebanyak 67% yang mempunyai hubungan dengan ekspresi gen p16 sebesar 83% (Reed *et al.*, 1996). Sedangkan pada kanker hepar sering terjadi mutasi p16 INK4a di Cina, namun jarang ditemukan di Jerman 0,03% dan Jepang 0,15% sepanjang ekson 2 pada kodon 148 (Volkman *et al.*, 1999). Penelitian mutasi gen p16 pada KSSRM masih sedikit dilaporkan dan cenderung meningkat serta diduga delesi homozigot merupakan mutasi yang paling sering terjadi dalam mekanisme inaktivasi gen p16 sebagai penyebab KSSRM yang mempunyai hubungan kuat dengan ekspresi gennya sebesar 87% di Inggris (Wu *et al.*, 1999). Ditaporkan deteksi mutasi gen p16 (ekson 1-3)

pada KSSRM di Amerika, ditemukan mutasi homozigot sebanyak 78% (Shahnavaz *et al.*, 2001). Beberapa peneliti lainnya melaporkan jarang terjadi adanya mutasi gen p16 pada KSSRM di India sebesar 1% dan di Taiwan mutasi gen p16 didapatkan sebanyak 6% yang mempunyai hubungan dengan lokasi tumor yaitu lidah (54%) dibandingkan dengan lokasi tumor lainnya (22%) dan dilaporkan pula mutasi gen p16 mempunyai hubungan dengan penderita perokok dan pengunyah tembakau (pengunang) sebesar 27% (Kannan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). Sedangkan di India dilaporkan adanya perubahan ekspresi gen p16 merupakan suatu tahap awal karsinogenesis rongga mulut yang berhubungan dengan derajat diferensiasi selnya (Pande *et al.*, 1988), namun peneliti lainnya melaporkan bahwa tidak terdapat hubungan antara ekspresi gen p16 KSSRM dengan derajat diferensiasi selnya (Williams, 2000). Dilaporkan adanya mutasi gen p16 dengan pemeriksaan PCR-SSCP pada KSSRM di Taiwan didapatkan sebanyak 54% dan terjadi mutasi delesi 14,6% yang tidak mempunyai hubungan yang signifikan dengan beberapa faktor klinikopatologis seperti lokasi dan stadium klinis kanker namun mempunyai hubungan yang signifikan dengan status TNM dan diferensiasi selnya yaitu diferensiasi baik dan jelek (Tsat *et al.*, 2001). Sedangkan peneliti Liu *et al.*, (2003) di Cina melaporkan kejadian mutasi p16 sebesar 27% dari 33 penderita KSSRM dengan pemeriksaan PCR-SSCP yang menunjukkan tidak adanya perbedaan mutasi gen p16 yang signifikan antara stadium klinis I sampai dengan stadium klinis IV ( $p > 0,05$ ) namun terdapat perbedaan signifikan antara stadium klinis I, II dan stadium klinis III, IV ( $p < 0,05$ ) dan mutasi gen p16 tidak mempunyai hubungan dengan diferensiasi baik maupun jelek serta penyebaran kelenjar getah bening regional.

Deteksi mutasi gen melalui inaktivasi GST pada fase G1/S berdasarkan komponen jalur p53 dan jalur Rb masih banyak yang belum terdeteksi atau belum jelas mekanismenya mengingat heterogenitas perubahan genetik pada faktor transkripsi gen-gen dalam karsinogenesis menyebabkan adanya perbedaan mutasi gen dan hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis pada ras, lokasi tumor, daerah atau faktor predisposisi resiko terjadinya kanker di berbagai keganasan di seluruh tubuh termasuk diantaranya adalah keganasan jenis KSSRM (Todd *et al.*, 1997; Gorgoulis *et al.*, 1998; Williams, 2000).

### 2.10 Gen Supresor Tumor p53

Gen supresor tumor p53 merupakan suatu gen yang menyandi 53-kd fosfoprotein nukleus yang terdiri atas 393 asam amino, terletak pada kromosom 17p13.1 yang mempunyai kemampuan mengikat DNA dan aktivitasnya diketahui sebagai faktor transkripsi yang mengontrol ekspresi dari berbagai gen seperti gen p21 Waf1/Cip1, MDM2, GADD45, 14-3-3 $\alpha$ , Bax dan KILLER/DR5 yang berperan penting pada pengendalian dan pengaturan siklus sel serta apoptosis (Wang *and* Wang, 1997; Sumasundaram *and* El-Deiry, 2000). Gen p53 diketahui pula mempunyai fungsi sebagai transkripsi represor pada berbagai gen yang mengalami inaktivasi p53 seperti Bcl 2, *fos*, *jun*, DNA polimerase  $\alpha$ , *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), retinoblastoma (Rb) dan *multidrug resistance* (MDR1), disamping itu p53 juga sebagai faktor transkripsi supresor gen Rb melalui sekuens aktivasi *cis*, GGAAGTGA pada promotor Rb (Wang *and* Wang, 1997). p53 merupakan GST yang berperan sangat penting pada mekanisme seluler, dapat mengadakan respons terhadap adanya stimulasi atau stress genotoksik seperti kerusakan DNA, hipoksia dan dapat mengatur keseimbangan gen-gen pada

penghentian laju pengendalian siklus sel atau siklus sel dapat berhenti sementara serta memicu adanya apoptosis (Godsell, 1999; Sumasundaram *and* El-Deiry, 2000). Adanya kerusakan DNA pada pengatur fase G1 terutama pada fase transisi G1/S mengakibatkan gangguan fungsi atau inaktivasi GST p53 pada kontrol regulasi siklus sel sehingga terjadi proliferasi tidak terkendali yang merupakan indikator adanya keganasan (Bartkova *et al.*, 1997). *Hot spot region* mutasi gen p53 sering terjadi pada ekson 5–8 di berbagai keganasan terutama sepanjang ekson 5 dan 7 (Bosari *et al.*, 1995; Leahy *et al.*, 1996; Somasundaram *and* El-Deiry, 2000). Desain primer untuk gen p53 pada daerah ekson 5 dan ekson 7 (*Gene bank accession number* U 94788) yaitu:

ekson 5<sup>1</sup> : 5' - TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT - 3'  
 5' - AGC AAT CAG TGA GGA ATC AG - 3'

ekson 5<sup>2</sup> : 5' - TTC AAC TCT GTC TCC TTC CT - 3'  
 5' - CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG - 3'

ekson 7<sup>1</sup> : 5' - CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA - 3'  
 5' - AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA - 3'

ekson 7<sup>2</sup> : 5' - AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT - 3'  
 5' - TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC - 3'

## 2.11 Gen Supresor Tumor p16

GST p16 terdiri atas 16-kd protein nukleus atau 156 asam amino yang terletak pada kromosom 9p21 dan berfungsi menghambat secara spesifik aktivitas CDK4 dan CDK6 serta menyebabkan fosforilasi pRb dapat melepaskan faktor transkripsi E2F yang diketahui terletak pada fase kritis G1/S sehingga siklus sel dapat berjalan normal. Menurut Sartor (1999), p16 dapat menghambat siklin D1 pada kanker rongga mulut dan lanng sehingga hilangnya fungsi p16 mengakibatkan proliferasi sel tidak terkendali sebagai pemicu terjadinya kanker rongga mulut dan



laring. Sedangkan Okami *et al.*, (1999) melaporkan amplifikasi siklin D1 yang terjadi pada kanker kepala dan leher tergantung adanya inaktivasi atau fungsi p16. Mekanisme pengaturan molekuler p16 dalam pertumbuhan sel yaitu menghambat aktivitas secara langsung mutasi genetik CDK4 atau CDK6 yang mekanismenya masih belum diketahui secara jelas (Coleman *et al.*, 1997). Penelitian mutasi gen p16 pada KSSRM masih sedikit dilaporkan dan cenderung meningkat serta diduga delesi homozigot merupakan mutasi yang paling sering terjadi dalam mekanisme inaktivasi gen p16 sebagai penyebab KSSRM yaitu terjadi pada lokasi *hot spot region* ekson 1, 2 dan 3 sebanyak 78%, yang mempunyai hubungan yang kuat dengan ekspresi gennya sebesar 87% (Wu *et al.*, 1999; Shahnava *et al.*, 2001).

Desain Primer untuk gen p16 (*Gene bank accession number* U 26727)

yaitu :

Ekson 1: 5'- AGA GGA GGG GCT GGC TGG TCA C - 3'  
3'- CCT CCA GAG TCG CCC GCC ATC C - 3'

Ekson 2: 5'- TCT GAG CTT TGG AAG CTC TTC AG - 3'  
3'- TTC CTG GAC ACG CTG GTG GT - 3'

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS

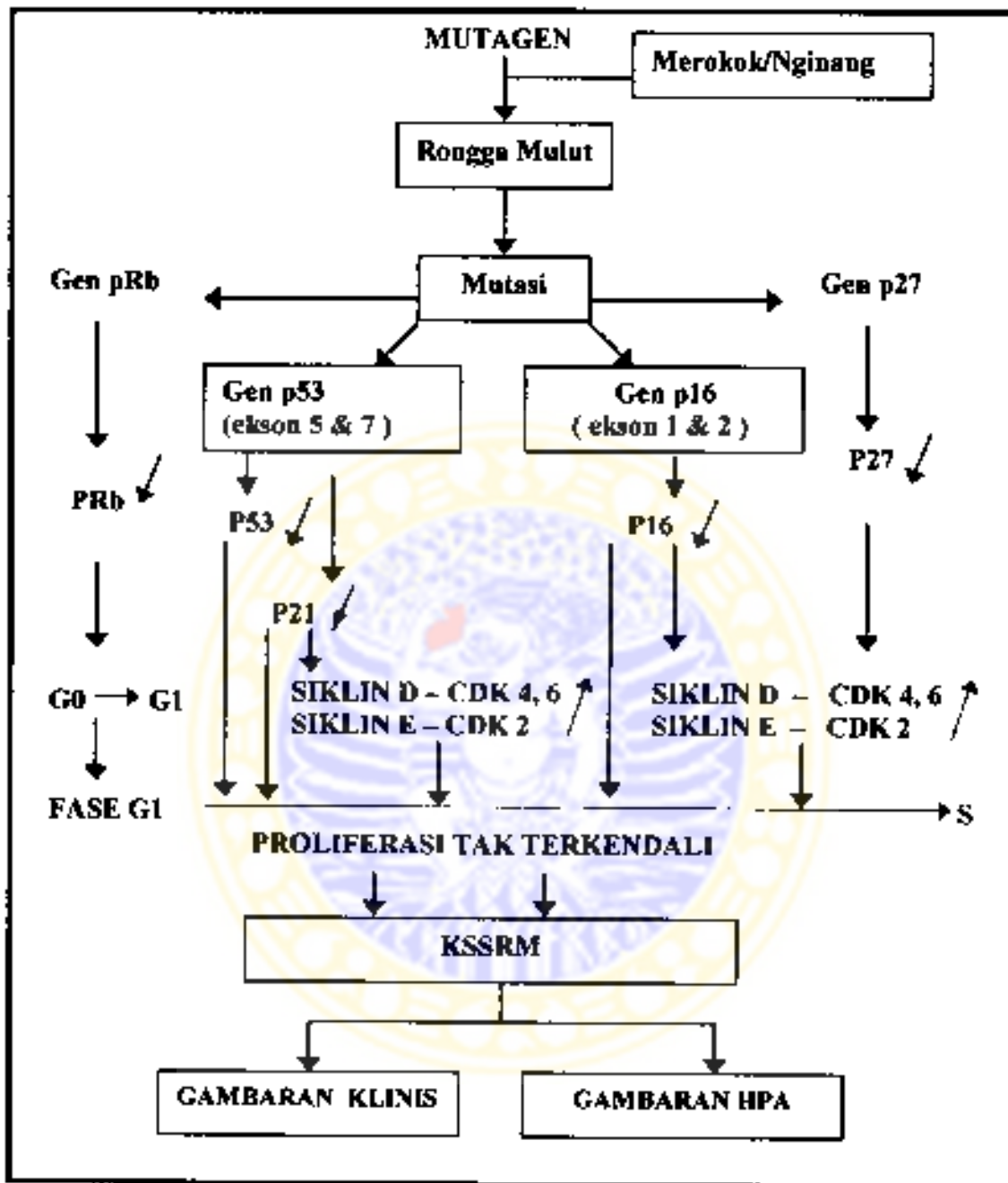
#### 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Adanya stimulus mutagen pada epitel keratinosit rongga mulut seperti bahan karsinogen pada penderita perokok/penginang yang terus menerus dalam jangka waktu lama pada gen penyandi molekul pengatur fase G1 siklus sel terutama pada fase titik restriksi yaitu fase G1 menuju fase S akan menyebabkan kerusakan DNA. Apabila kerusakan DNA tersebut tidak diperbaiki maka akan terjadi mutasi pada gen-gen pengatur molekuler negatif pada jalur p53 adalah p53 dan p21 sedangkan jalur Rb terjadi mutasi gen p16, pRb dan p27 sehingga terjadi penurunan ekspresi pada P53, P21, P16, PRb dan P27. Adanya mutasi gen terutama gen p53 dan p16 dapat menyebabkan penurunan ekspresi P53 dan P16 serta terjadi peningkatan ekspresi yang berlebihan pada gen siklin D yang berpasangan dengan CDK4, 6 dan siklin E yang berikatan dengan CDK2. Mutasi gen yang terus menerus terjadi pada fase G1/S siklus sel akan mengakibatkan proliferasi sel tidak terkendali sebagai penyebab keganasan pada rongga mulut terutama KSSRM. Pada penelitian ini, peneliti lebih memusatkan kajian pada mutasi gen p53 pada jalur p53 dan gen p16 pada jalur Rb mengingat kedua gen tersebut sering merupakan target penelitian pada berbagai keganasan di seluruh tubuh dan juga sering mengalami mutasi dibandingkan dengan gen p21 dan pRb serta p27 bahkan sampai saat ini mutasi yang terjadi pada gen p21, p27 dan pRb pada KSSRM masih belum banyak dilaporkan.

Mengingat GST p53 merupakan pusat pengendalian molekuler siklus sel dan dapat menghentikan laju proliferasi sel atau *growth arrest* pada fase G1,

diferensiasi sel dan apoptosis sebagai respon terhadap adanya stimulasi mutagen. Kemudian aktivasi onkogen D1, Cdk4,6, siklin E dan Cdk2 belum cukup dapat menyebabkan adanya keganasan dan telah diketahui bahwa kanker disebabkan oleh lebih dari 1 gen (Todd *et al.*, 1997; Sherr, 1998) maka penelitian ini lebih banyak ditujukan pada GST p53 dan p16 yang berperan paling penting dan secara langsung dapat menghambat aktivitas molekul pengatur pada fase G1/S siklus sel dan sering mengalami mutasi pada berbagai keganasan serta berkorelasi linier dan konsisten dengan aktivitas pembelahan sel. Dengan demikian peneliti menduga bahwa ada perubahan molekuler yaitu adanya perbedaan mutasi gen p53 (ekson 5 dan 7) dan p16 (ekson 1 dan 2) yang mempunyai hubungan dengan gambaran klinis seperti umur, perokok/penginang, stadium klinis dan histopatologis KSSRM dengan derajat diferensiasi sel baik dan jelek yang mencerminkan adanya derajat keganasan KSSRM. Adanya perubahan molekuler tersebut diharapkan dapat mengungkap patogenesis molekuler KSSRM berdasarkan pola mutasi GST p53 dan p16 yang berguna untuk dapat menentukan diagnosis, prognosis dan terapi yang lebih tepat dalam penanganan KSSRM.

### Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan :  $\rightarrow$  = Stimulasi       $\nearrow$  = Peningkatan       $\searrow$  = Penurunan

$\square$  = yang diperiksa

Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian



### **3.2 Hipotesis Penelitian**

1. Terdapat perbedaan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 dan p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut
2. Terdapat hubungan antara umur dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
3. Terdapat hubungan antara umur dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
4. Terdapat hubungan antara perokok/penginang dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
5. Terdapat hubungan antara perokok/penginang dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
6. Terdapat hubungan antara stadium klinis dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p53 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
7. Terdapat hubungan antara stadium klinis dengan kejadian mutasi gen supresor tumor p16 pada karsinoma skuamosa rongga mulut.
8. Terdapat hubungan antara diferensiasi sel baik dan jelek dengan mutasi gen supresor tumor p53 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.
9. Terdapat hubungan antara diferensiasi sel baik dan jelek dengan mutasi gen supresor tumor p16 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian observasional analitik jenis *comparative study* dengan menggunakan rancangan *cross sectional*. Subyek yang di observasi adalah penderita yang telah dilakukan pemeriksaan dengan diagnosis klinis diduga KSSRM dan dengan pemeriksaan histopatologis adalah penderita KSSRM serta penderita normal yang memenuhi syarat penelitian. Kemudian dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok KSSRM dan kelompok kontrol yang terdiri dari semua jaringan penderita normal yang didapat dari jaringan normal diatas gigi geraham ke-3 tertanam (impaksi) dengan indikasi operasi

Semua penderita kelompok KSSRM dan kelompok kontrol yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan pengamatan ada tidaknya mutasi gen p53 dan p16 dengan teknik PCR-SSCP yaitu dengan menggunakan primer spesifik gen p53 (ekson 5, 7) dan p16 (ekson 1, 2) dibandingkan dengan kelompok kontrol.

#### 4.2 Populasi, Sampel Penelitian dan Besar Sampel

Populasi acuan adalah semua penderita yang datang di Bagian Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi (FKG) Universitas Airlangga (Unair) Surabaya dan Poli Onkologi Satuan Medik Fungsional (SMF) Telinga Hidung dan Tenggorok (THT) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Sutomo Surabaya dengan diagnosis klinis diduga karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

Sampel penelitian adalah semua jaringan segar hasil biopsi atau operasi penderita dengan diagnosis klinis dan histopatologis KSSRM dan jaringan normal yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi semua penderita yang datang di Bagian Bedah Mulut FKG Unair dan Poli Onkologi SMF THT RSUD Dr. Sutomo Surabaya.

Kriteria inklusi yang dimaksud adalah kriteria yang memenuhi syarat variabel penelitian yaitu:

1. Umur penderita KSSRM mulai 40 tahun sampai lebih dari 65 tahun baik laki maupun wanita
2. Lokasi tumor masuk dalam kategori rongga mulut yang paling banyak terkena KSSRM yaitu lidah, palatum, gusi atau mandibula.
3. Perokok atau pengunyah sirih (penginang) yaitu penderita perokok lebih 3 bungkus sehari atau pengunyah sirih (penginang) yang dilakukan lebih dari 2 kali sehari secara terus menerus.
4. Penampilan status penderita dipakai untuk mengukur kualitas hidup penderita adalah derajat 0, 1, dan 2 yaitu :
  - a. Derajat 0 = baik, dapat bekerja normal tanpa batasan.
  - b. Derajat 1 – cukup, tidak dapat bekerja berat tetapi dapat bekerja ringan.
  - c. Derajat 2 lemah, tidak dapat bekerja tetapi dapat jalan dan merawat diri sendiri dan lebih dari 50% dari waktu bangun.
5. Stadium klinis berdasarkan sistem TNM dari UICC yang masuk dalam kriteria inklusi yaitu stadium I ( $T_1N_0M_0$ ), stadium II ( $T_2N_0M_0$ ), stadium III ( $T_3N_0M_0$ ,  $T_1N_1M_0$ ,  $T_2N_1M_0$ ,  $T_3N_1M_0$ ) dan

stadium IV (T<sub>4</sub>N<sub>0</sub>M<sub>1</sub>Mo, T<sub>4</sub>pTN<sub>2</sub>N<sub>3</sub>Mo) tanpa metastase jauh (M1) ke paru, jantung dan otak.

6. Tidak ditemukan adanya kelainan sekunder yang berat melalui pemeriksaan fisik (klinis), laboratorium darah lengkap dan urin (faal hemostasis, LFT, LDL, BUN, serum kreatinin, kadar gula darah acak) serta pemeriksaan radiologis (foto thorak, CT Skanning otak, kepala) seperti kelainan otak, jantung, paru, ginjal, hipertensi serta diabetes mellitus yang dapat memperberat keadaan status penampilan penderita.
7. Penderita KSSRM yang belum mendapat terapi radiasi dan kemoterapi.

Kriteria eksklusi yang dimaksud adalah kriteria yang tidak memenuhi syarat variabel penelitian yaitu:

1. Umur penderita KSSRM kurang dari 40 tahun baik laki-laki maupun wanita.
2. Lokasi tumor tidak termasuk dalam kategori rongga mulut yang paling banyak terkena KSSRM.
3. Perokok atau pengunyah sirih (penginang) yaitu penderita perokok kurang dari 3 bungkus sehari atau pengunyah sirih (penginang) yang dilakukan kurang dari 2 kali sehari dan tidak terus menerus.
4. Penampilan status penderita derajat 3 dan 4 yaitu penderita derajat 3 (status penampilan jelek); tidak dapat jalan, tetapi dapat bangun sendiri dan perlu tiduran > 50% dari waktu bangun dan derajat 4 (status penampilan sangat jelek); penderita tidak dapat



bangun sendiri dan merawat diri sendiri dan penderita hanya tiduran saja di tempat tidur atau kursi.

5. Stadium klinis yang termasuk kriteria eksklusi adalah stadium 0 (T<sub>is</sub>,N0M0) dan stadium IV (T<sub>1ap</sub>I,T<sub>1ap</sub>N,M<sub>1</sub>) dengan metastase jauh (M1). Pada foto waters nampak ada gambaran metastase kanker ke daerah sinus maksilaris, cavum nasi. Foto CT skanning kepala nampak gambaran hiper atau hipodens pada daerah otak. Foto thoraks nampak metastase ke paru ditandai dengan adanya gambaran uang logam (*coin lesion*).
6. Ditemukan adanya kelainan sekunder yang berat seperti: kelainan otak yaitu koma, sepalgia, kehilangan penglihatan, neuroplegia, serangan *syncope*, epilepsi, vertigo, tekanan intrakranial naik dll. Terdapat kelainan jantung seperti dekompensasi jantung, insufisiensi koroner; kelainan paru seperti effusi pleura, pneumonia dll. Kelainan ginjal seperti retensi urin, gagal ginjal dll. Kelainan hati seperti nodul mutipel, sirosis hepatis, ikterus, asites, kenaikan SGOT/SGPT/LDH, hepatomegali dll. Kelainan hipertensi yaitu tekanan darah >160/120 mmHg. Kelainan diabetes mellitus seperti kadar gula darah atas acak lebih dari 200 mg/dl yang dapat memperberat keadaan status penampilan penderita.
7. Penderita KSSRM yang sudah di terapi radiasi dan kemoterapi.

Sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok KSSRM dan kelompok kontrol. Kelompok kontrol yaitu kelompok jaringan normal yang didapat dari

jaringan normal diatas gigi geraham ke-3 tertanam (impaksi) dengan indikasi operasi pada pendenta normal diatas umur 18 tahun sampai dengan 25 tahun.

Besar sampel yang digunakan untuk penelitian ini adalah 40 jaringan KSSRM. Besar sampel ditentukan berdasarkan perhitungan sampel dengan menggunakan rumus besar sampel penelitian observasional (Zainuddin, 1999):

$$n = \frac{N \times Z_{\alpha}^2 \times p \times q}{d^2 \times (N-1) + Z_{\alpha}^2 \times p \times q}$$

$$n = \frac{300 \times (1,96)^2 \times 0,03 \times 0,97}{(0,05)^2 (300-1) + (1,96)^2 \times 0,03 \times 0,97}$$

$$n = \frac{33,54}{0,859}$$

$$n = 39,0289 \text{ minimal besar sampel.}$$

Keterangan:

- n ~ Besar sampel.
- N = Perkiraan besar populasi (N=300) berdasarkan pengalaman atau dengan mengambil data kasus KSSRM dalam kurun waktu 7 tahun sebelumnya.
- $Z_{\alpha}$  = Nilai standar normal yang besarnya tergantung besar  $\alpha$  yang digunakan, dalam hal ini digunakan  $\alpha = 5\%$  (0,05) sehingga didapat  $Z_{\alpha} = 1,96$ .
- p = Estimasi proporsi populasi suatu kejadian yang akan diteliti.
- q = 1- p.
- d = Besarnya penyimpangan yang masih bisa ditolerir atau batas toleransi kesalahan (5% =0,05).

Hasil penghitungan besar sampel dengan menggunakan rumus diatas maka besar sampel didapatkan n = 40.

### 4.3. Teknik Pengambilan Sampel

Teknik sampling yang digunakan adalah *purposive* sampling pada lokasi penelitian yaitu di Bagian Bedah Mulut FKG Unair Surabaya dan Poli Onkologi SMF THT RSUD Dr. Sutomo Surabaya yang dianggap homogen pelayanannya.

### 4.4 Variabel Penelitian

- 4.4.1 Variabel bebas** : Usia, perokok atau pengunyah sirih, stadium klinis dan KSSRM diferensiasi sel baik dan jelek.
- 4.4.2 Variabel tergantung** : Mutasi gen p53 (mutasi ekson 5 dan 7) dan mutasi gen p16 (mutasi ekson 1 dan 2) KSSRM
- 4.4.3 Variabel kendali** : Status penampilan penderita, kelainan sekunder, penderita telah mendapat terapi radiasi, kemoterapi dan terdapat metastase jauh.

### 4.5 Definisi Operasional Penelitian

1. Usia yang dimaksud adalah usia penderita pada saat datang di Poli Onkologi SMF / THT RSUD Dr. Sutomo dan Bagian Bedah Mulut FKG Unair berdasarkan pada tahun kelahiran yang didapat dari hasil anamnesa, KTP atau dari catatan medis penderita. Usia yang masuk dalam kriteria inklusi variabel penelitian dikelompokkan menjadi tiga kelompok yaitu usia antara 40–50 tahun, 51–60 tahun dan lebih dari 60 th.
2. Perokok atau pengunyah sirih (penginang) yang dimaksud adalah penderita pada saat datang di Bagian Bedah Mulut FKG Unair dan Poli Onkologi SMF/THT RSUD Dr. Sutomo berdasarkan anamnesa atau dari catatan medis. Perokok/penginang yang masuk dalam kriteria inklusi

variabel penelitian dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perokok atau peminang dan kelompok tidak perokok atau peminang.

3. Stadium klinis yang dimaksud adalah stadium tumor penderita yang diperoleh dari hasil pemeriksaan status TNM yang merupakan status gambaran klinis penderita berdasarkan klasifikasi UICC Stadium penderita yang masuk dalam variabel penelitian (kriteria inklusi) dibagi dalam 2 kelompok yaitu kelompok 1 terdiri dari stadium I dan II serta kelompok 2 terdiri dari stadium III dan IV tanpa metastase jauh.
4. Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) diferensiasi baik dan jelek yang dimaksud adalah KSSRM yang didapat dari data catatan medis di Poli Onkologi THT RSUD Dr. Sutomo atau dari hasil pemeriksaan jaringan hasil biopsi atau operasi dengan diagnosis klinis kanker rongga mulut dan penetapan KSSRM berdasarkan pemeriksaan HPA dengan pengecatan reguler hematoxilin eosin (HE). Hasil pemeriksaan HPA yaitu didapatkan 75% *well differentiated* (diferensiasi baik) dan 50% *moderately differentiated* (diferensiasi sedang) sedangkan 75% *poorly differentiated* (diferensiasi jelek) dan *undifferentiated* (tidak terdiferensiasi). Kemudian dikelompokkan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok diferensiasi baik dan jelek.
5. Mutasi gen p53 (ekson 5, ekson 7) yang dimaksud adalah mutasi gen yang terjadi pada p53 yang didapatkan dari mutasi p53 ekson 5 dan atau p53 ekson 7. Pengukuran atau penetapan mutasi gen p53 berdasarkan hasil deteksi mutasi PCR-SSCP dibandingkan kelompok kontrol yaitu didapatkan mutasi positif (+) dinilai dengan skor 1 dan mutasi negatif



(-) dinilai dengan skor 0. Mutasi gen p53 positif (+) bila didapatkan dari hasil mutasi gen p53 ekson 5 dan atau p53 ekson 7 yang positif yaitu hasil pengamatan migrasi pita DNA pada pengecatan perak nitrat sehingga terlihat ketebalan pita (*band*) DNA antara 2 sampai dengan 3 atau 4 *band* yang tidak sama posisinya dengan 2 pita DNA kontrol. Sementara mutasi gen p53 negatif (-) didapatkan dari hasil mutasi gen p53 ekson 5 dan atau p53 ekson 7 yang negatif (-) yaitu hasil pengamatan migrasi 2 pita DNA p53 ekson 5 dan atau p53 ekson 7 yang terletak sama dengan posisi 2 pita DNA kontrol (Orita *et al.*, 1989). Kontrol hasil pengamatan mutasi gen dilakukan bersama-sama dengan pengamat ahli (*second observer*) sehingga hasil deteksi mutasi gen menunjukkan validitas hasil penelitian.

6. Mutasi gen p16 (ekson 1, ekson 2) yang dimaksud adalah mutasi gen yang terjadi pada p16 yang didapatkan dari mutasi p16 ekson 1 dan atau p16 ekson 2. Pengukuran atau penetapan mutasi p16 berdasarkan hasil deteksi mutasi PCR-SSCP dibandingkan kelompok kontrol yaitu didapatkan mutasi positif (+) diberi nilai atau skor 1 dan mutasi negatif (-) diberi nilai atau skor 0. Mutasi gen p16 positif (+) bila didapatkan dari hasil mutasi gen p16 ekson 1 dan atau p16 ekson 2 yang positif yaitu hasil pengamatan migrasi pita DNA pada pengecatan perak nitrat terlihat ketebalan pita (*band*) DNA antara 2 sampai dengan 3 atau 4 *band* yang tidak sama posisinya dengan 2 pita DNA kontrol. Sementara mutasi gen p16 negatif (-) didapatkan dari hasil mutasi gen p16 ekson 1 dan atau p16 ekson 2 yang negatif (-) yaitu hasil pengamatan migrasi 2 pita DNA gen p16 ekson 1 dan atau p16 ekson 2 yang terletak sama dengan posisi 2 pita DNA

kontrol (Orita *et al.*, 1989). Kontrol hasil pengamatan mutasi gen dilakukan bersama-sama dengan pengamat ahli (*second observer*) sehingga hasil deteksi mutasi gen menunjukkan validitas hasil penelitian.

7. Status penampilan penderita yang dimaksud dalam variabel kendali adalah pengukuran kualitas hidup seseorang yang sudah derajat 3 (jelek); tidak dapat jalan, tetapi dapat bangun sendiri dan perlu tiduran lebih dari 50% dari waktu bangun dan derajat 4 (sangat jelek); tidak dapat bangun dan merawat diri sendiri, penderita hanya tiduran saja di tempat tidur atau kursi (WHO, 1979)
8. Kelainan sekunder yang dimaksud dalam variabel kendali adalah penyakit-penyakit sistemik yang menyertai (ko-morbiditas) penderita KSSRM yang tidak dimasukkan dalam kriteria penelitian (kriteria eksklusi) seperti penyakit jantung, hipertensi, penyakit hati, kelainan otak, kelainan paru, kelainan diabetes mellitus, kelainan ginjal.
9. Penderita telah di terapi radiasi dan kemoterapi serta terdapat metastase jauh yang dimaksud dalam variabel kendali adalah semua penderita KSSRM dengan metastase jauh dan telah dilakukan terapi radiasi dan kemoterapi sehingga dimasukkan dalam kriteria eksklusi penelitian dan dijadikan faktor variabel kendali penelitian.

## 4.6 Bahan Penelitian

Semua bahan yang digunakan untuk pemeriksaan PCR-SSCP seperti:

### 4.6.1 Bahan untuk penyimpanan jaringan segar:

Nitrogen cair – 70 °C sampai dengan - 80 °C.

### 4.6.2 Ekstraksi DNA

Fenol /kloroform (CIAA), isopropanol, larutan 10 mM Tris HCl, NaCl, 1% SDS dan 1mM EDTA yang disebut sebagai larutan *buffer* TE.

### 4.6.3 Isolasi DNA dan pemurnian DNA

Larutan PBS, larutan *buffer* TE dan proteinase-K serta gel agarose (Sigma).

### 4.6.4 PCR - SSCP

Bahan pereaksi terdiri atas: dH<sub>2</sub>O, larutan *buffer*, dNTP, primer untuk gen p53 yaitu:

ekson 5<sup>1</sup>: 5' - TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT - 3'  
5' - AGC AAT CAG TGA GGA ATC AG - 3'

ekson 5<sup>2</sup>: 5' - TTC AAC TCT GTC TCC TTC CT - 3'  
5' - CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG - 3'

ekson 7<sup>1</sup>: 5' - CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA - 3'  
5' - AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA - 3'

ekson 7<sup>2</sup>: 5' - AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT - 3'  
5' - TGT GCA GGG TGG CAA GIG GC - 3'

sedangkan primer untuk gen p16 yaitu

ekson 1: 5' - AGA GGA GGG GCT GGC TGG TCA C - 3'  
5' - CCT CCA GAG TCG CCC GCC ATC C - 3'

ekson 2: 5' - TCT GAG CTT TGG AAG CTC TTC AG - 3'  
5' - TTC CTG GAC ACG CTG GTG GT - 3'

Bahan PCR lainnya yang diperlukan adalah *Tag DNA Polymerase* (Sigma), *mineral oil*, kertas parafilm, etidium bromid, gel agarose.

Bahan analisis SSCP yaitu formamid, larutan nitrogen  $-80^{\circ}\text{C}$ , *loading buffer*, gel akrilamid 12% yang terdiri atas akrilamid, *bis akrilamid*, *buffer TBE*, *TEMED*, gliserol dan  $\text{dH}_2\text{O}$ , dan 7,5% asam asetat.

Bahan untuk pengecatan perak nitrat memerlukan  $\text{dH}_2\text{O}$ , larutan perak nitrat ( $\text{AgNO}_3$  + formamid), larutan *developer* ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + formaldehid), sodium tiosulfat dan larutan fiksasi (asam asetat).

#### 4.7 Alat Penelitian

##### 4.7.1 Diagnosis klinis

Alat untuk pemeriksaan klinis penderita yang diduga KSSRM untuk yaitu dengan kaca mulut dan sarung tangan steril.

##### 4.7.2 Pengambilan jaringan biopsi

Pisau pengiris (*scalpel*), alat kuret, klem arteri, gunting, *Nalgene Cryogenic Vial*.

##### 4.7.3 Isolasi DNA

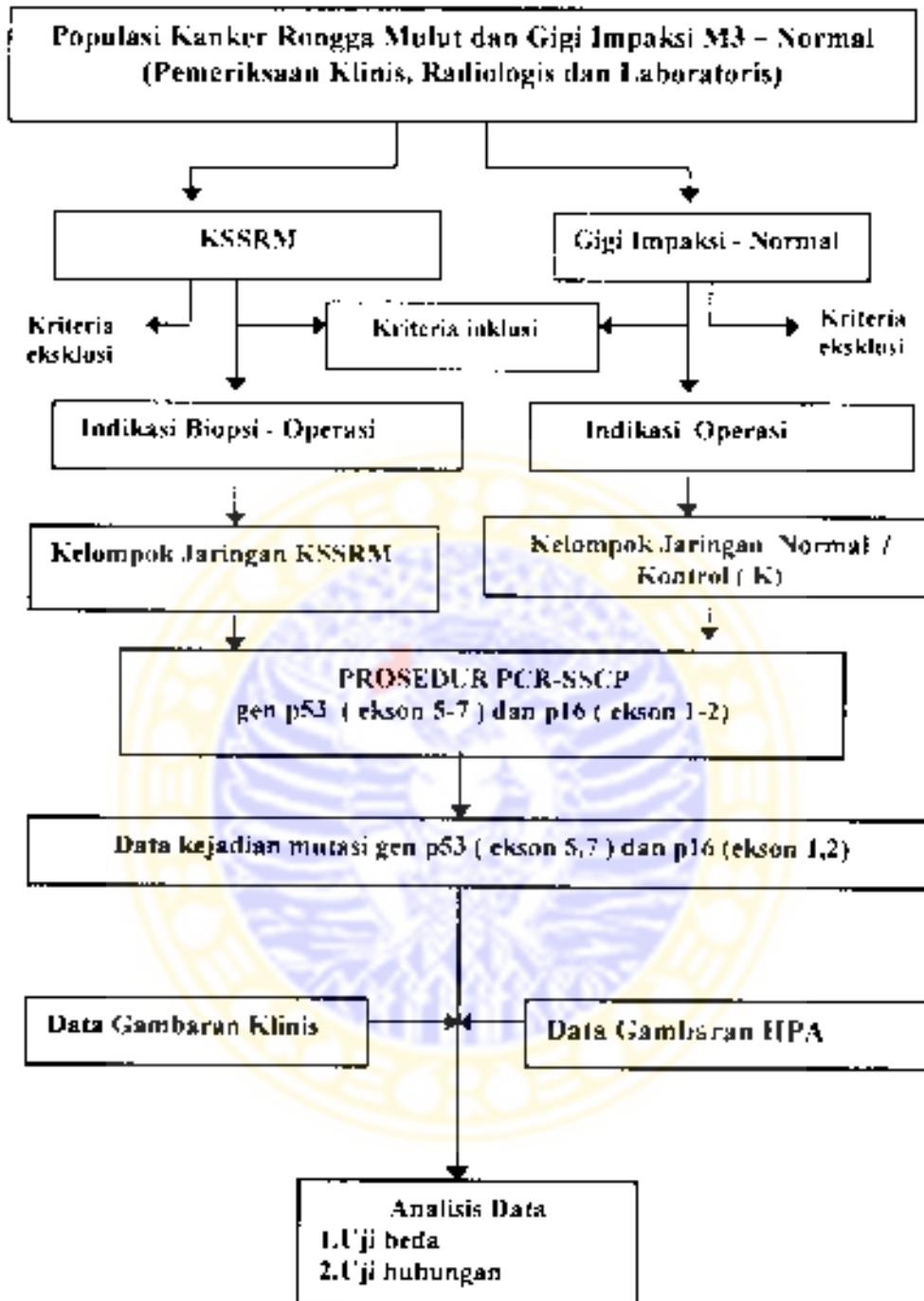
Pisau pengiris, gunting, *cryostat*, mikrotom, tabung *ependorf*, *ependorf shaker* (*ependorf mixer S432*), inkubator, vortek, alat sentrifus, spektrometri dan alat elektroforesis.

##### 4.7.4 PCR - SSCP

Tabung *ependorf*, vortek, alat sentrifus, *thermocycler*, alat *shaker*, inkubator, *freezer*  $4^{\circ}\text{C}$ , *waterbath*, ultra violet (uv) transluminator, foto polaroid.



#### 4.8 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

#### 4.9 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian untuk diagnosis klinis di Bagian Bedah Mulut FKG Unair dan pengambilan sampel biopsi di Poli Onkologi SMP/THT RSUD Dr. Sutomo serta Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD Dr. Sutomo. Kemudian sampel penelitian dikumpulkan dan disimpan dalam *freezer* -- 80°C di Laboratorium TDC Unair, Surabaya dan Lab. Patobiologi Fakultas Kedokteran (FK) Unair untuk kemudian dilakukan pemeriksaan jaringan biopsi dengan metode PCR-SSCP di Lab. TDC Universitas Airlangga, Surabaya dan Lab. Rekayasa Genetika, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

Waktu penelitian pengambilan sampel dimulai pagi hari jam 08.00 sampai jam 16.00 sore hari mulai bulan Agustus 1995 sampai dengan Agustus 2002 dan mulai dikerjakan sampel penelitian awal September 2002 sampai dengan April 2004. Setelah analisis data terkumpul maka dilakukan uji hipotesis dan diharapkan selesai hasil penelitian tahun 2004.

#### 4.10 Prosedur Pengumpulan Data

Tahapan penelitian yaitu diagnosis klinis KSSRM, penjelasan pada penderita mengenai penelitian yang akan dilakukan, pengisian formulir dan tanda tangan persetujuan oleh penderita untuk berpartisipasi dalam penelitian (*informed consent*). Apabila penderita setuju maka dilakukan pengambilan darah dan urine untuk memeriksa penderita memenuhi syarat kriteria n sampel yaitu hasil pemeriksaan laboratorium darah lengkap dan urine; Hb, leukosit, eritrosit, LED, SGOT, SGPT, LFT, albumin, serum kreatinin, BUN, asam urat, kadar gula acak, kolesterol total untuk mengetahui apakah penderita tidak mempunyai penyakit sekunder seperti kelainan jantung, paru, hati, diabetes mellitus, ginjal dan otak serta

dilakukan pemeriksaan radiologis (panoramik, thoraks, CT scan) untuk mengetahui ada tidaknya metastase jauh ke organ paru, otak dan jantung serta pemeriksaan status penampilan penderita yang memenuhi syarat kriteria inklusi sampel penelitian. Kemudian dilakukan prosedur pengambilan biopsi penelitian dan pengambilan jaringan normal penderita untuk kelompok kontrol yang dilakukan dengan cara pengambilan jaringan normal diatas gigi impaksi molar ke-3 pada kelompok penderita yang setuju untuk dilakukan operasi dengan data medik yang memenuhi kriteria inklusi sampel penelitian di Bagian Bedah Mulut FKG Unair Surabaya.

#### **4.10.1 Cara pengambilan sampel biopsi**

Semua prosedur biopsi sampel dilakukan dengan menggunakan anestesi umum di Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD Dr. Sutomo, Kamar Operasi THT RSUD Dr. Sutomo atau anestesi blok regional di Poli Onkologi SMF THT RSUD Dr. Sutomo dan di Bagian Bedah Mulut FKG Unair.

Cara pengambilan biopsi dilakukan melalui 2 cara yaitu:

1. Biopsi insisi yaitu hanya sebagian kecil dari tumor yang diambil dengan menggunakan pisau untuk pemeriksaan. Pengambilan jaringan harus representatif mengingat kesalahan pengambilan jaringan sampel penelitian akan menimbulkan kesalahan hasil pemeriksaan HPA yang tidak sesuai dengan gambaran klinis. Kriteria pengambilan biopsi insisi sebaiknya dilakukan pada kasus KSSRM secara klinis meragukan dan kesan sudah inoperabel (tidak dapat dilakukan operasi).
2. Biopsi eksisi yaitu pengambilan seluruh tumor untuk pemeriksaan HPA sehingga sekaligus juga merupakan terapi khususnya untuk biopsi kelenjar limfe

dan pada kasus tumor masih kecil atau kasus operabel. Pengumpulan spesimen hasil biopsi dengan diagnosis pasti histopatologis KSSRM dan jaringan normal penderita kemudian dikelompokkan menjadi dua yaitu kelompok 1: KSSRM dan kelompok 2: kelompok kontrol atau kelompok jaringan normal. Kemudian dilakukan penyimpanan jaringan sampel penelitian.

#### 4.10.2 Cara penyimpanan sampel biopsi

Penyimpanan jaringan hasil biopsi atau operasi KSSRM digunakan tabung kecil khusus untuk jaringan segar biopsi yaitu *Nulgene Cryogenic Vial*. Kemudian disimpan dalam lemari es pendingin (*Freezer*) - 80°C di Lab. Patobiologi GRAMIK Fakultas Kedokteran (FK) Unair dan di Lab. TDC Unair Surabaya sebelum dilakukan deteksi mutasi dengan metode PCR-SSCP di Lab. Rekayasa Genetika Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta.

#### 4.10.3 Metode PCR – SSCP

Protokol standar PCR untuk penggandaan DNA pada umumnya mempunyai prinsip yang sama namun tidak semua protokol dapat berlaku pada semua keadaan dan tempat penelitian yang akan dilakukan penelitian. Sehingga diperlukan optimasi PCR sebelum menemukan kondisi protokol PCR yang tepat meliputi persiapan sampel, pemilihan primer atau desain primer untuk gen p53 dan p16 serta variasi *Taq* DNA polimerase, konsentrasi dioksiribosenukleosida trifosfat (dNTP), konsentrasi magnesium klorida (Mg Cl<sub>2</sub>) dan jumlah siklus

Desain primer untuk gen p53 yang dipilih adalah ekson 5 dan 7

(*Gene bank accession number* U 94788) sebagai berikut:

ekson 5<sup>1</sup>: 5' - TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT - 3'  
5' - AGC AAT CAG TGA GGA ATC AG - 3'

300 bp

ekson 5<sup>2</sup>: 5' - TTC AAC TCT GTC TCC TTC CT - 3'  
5' - CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG - 3'

ekson 7<sup>1</sup>: 5' - CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA - 3'  
5' - AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA - 3'

300 bp

ekson 7<sup>2</sup>: 5' - AGG CGC ACT GGC CTC ATC TT - 3'  
5' - TGT GCA GGG TGG CAA GTG GC - 3'

Desain primer untuk gen p16 yang dipilih adalah ekson 1 dan ekson 2

(*Gene bank accession number* U 26727) sebagai berikut:

ekson 1: 5' - AGA GGA GGG GCT GGCTGG TCA C - 3'  
5' - CCT CCA GAG TCG CCC GCC ATC C - 3'

125 bp

ekson 2: 5' - TCT GAG CTT TGG AAG CTC TTC AG - 3'  
5' - TTC CTG GAC ACG CTG GTG GT - 3'

307 bp

Persiapan isolasi DNA baik pada 40 sampel KSSRM maupun kelompok kontrol menggunakan protokol isolasi DNA dengan modifikasi yaitu pengambilan sampel jaringan biopsi KSSRM dan jaringan normal dengan ukuran 1x1x1 cm dengan skalpel. Sampel dicuci dengan PBS dalam tabung *ependorf* kemudian ditambahkan larutan *buffer* 700µl yang terdiri dari 50 mM Tris HCl, pH 8, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS. Ditambahkan 50µl dari 10-20 mg/ml proteinase-K



dan di inkubasikan sampai semalam pada suhu 55° C hingga diperoleh suspensi sel. Ekstraksi DNA dari jaringan KSSRM dan jaringan kontrol masing-masing dengan menggunakan 0,5 ml fenol/*CIAA* dan diputar dengan alat *ependorf shaker* (*ependorf mixer* 5432) selama 2 jam. Kemudian di sentrifus selama 5 menit dan dipindahkan suspensi sel kedalam tabung *ependorf* baru. Selanjutnya suspensi sel tersebut dipindahkan lagi kedalam tabung baru dan sesudah itu ditambahkan 500µl isopropanol/etanol sehingga didapatkan cairan presipitat (endapan) dan dibuang supernatannya. Tambahkan larutan 500µl *TE buffer* pada endapan suspensi sel pada tabung *ependorf* khusus dan di inkubasi selama satu malam pada suhu ruangan dan kemudian setelah selesai, tabung *ependorf* diputar-putar dengan tangan agar tercampur. Identifikasi DNA dengan menggunakan elektroforesa gel agarose 2% dan di visualisasi dengan *UV Light*. Pemeriksaan kadar DNA dapat dilakukan pula dengan alat spektrometri (Sambrook *et al.*, 1989).

Pemeriksaan PCR dengan menggunakan pereaksi 19 µl dH<sub>2</sub>O, 5µl dari 10 X *PCR Buffer* (15nM), 2 µl dNTP dan 2 µl *Taq* 1 unit/µl atau dapat digunakan *PCR Ready to go* dengan menambahkan 2 µl primer 1 dari gen p53 dan p16, 2 µl primer 2 dari gen p53 dan gen p16, 2 µl DNA masing-masing sampel kelompok jaringan sehingga didapatkan pereaksi sejumlah 25 µl pada kelompok KSSRM maupun pada kontrol (Sambrook *et al.*, 1989). Mengingat optimasi PCR GST p53 dan p16 penting untuk mendapatkan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada 40 sampel KSSRM yang terdiri dari 40 unit jaringan untuk deteksi mutasi gen p53 untuk ekson 5, 40 unit jaringan untuk deteksi mutasi gen p53 untuk ekson 7, 40 unit jaringan untuk deteksi mutasi gen p16 untu ekson 1 dan

40 unit jaringan untuk deteksi mutasi gen p16 untuk ekson 2, masing - masing terdiri dari setiap 10 jaringan dari 40 unit jaringan p53 (ekson 5 dan 7) dan p16 (ekson 1 dan 2) dibandingkan dengan 1 kontrol jaringan normal untuk memudahkan pengamatan, Pemeriksaan PCR gen p53 pada ekson 5 dan 7 agak berbeda dengan gen p16 baik pada kelompok KSSRM maupun kontrol.

Pemeriksaan PCR pada gen p53 ekson 5 menggunakan percakasi sebagai berikut: PCR *head* atau PCR *Ready to go*, 2µl DNA sampel KSSRM, 1µl primer 1 ekson 5<sup>1</sup>, 1µl primer 2 ekson 5<sup>1</sup>, 21 µl dH<sub>2</sub>O dalam tabung *ependorf* dan dilakukan vorteks. Prosedur yang sama dilakukan pada kelompok kontrol, kemudian dilakukan amplifikasi ulang dengan program PCR sebagai berikut. denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 55°C selama 2 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 56°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 2 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit setelah didapatkan hasil optimasi PCR 1 pita DNA. Kemudian hasil produk optimasi PCR ekson 5<sup>1</sup> sebanyak 5 µl sebagai *template* untuk p53 ekson 5<sup>2</sup> yaitu dengan menambahkan 1 µl primer 1 ekson 5<sup>2</sup>, 1µl primer 2 ekson 5<sup>2</sup>, PCR *Ready to go*, 18 µl dH<sub>2</sub>O. Program PCR ekson 5<sup>2</sup> yaitu dengan tahapan denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 61 C selama 2 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 62°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 2 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit. Identifikasi DNA PCR ekson 5<sup>2</sup> dengan elektroforesis gel agarose 2%, voltase konstan 100 volt. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol, maka didapatkan sampel DNA produk PCR p53 ekson 5 yang

optimum atau sesuai dengan produk PCR yang diharapkan baik pada p53 ekson 5 KSSRM maupun kontrol (jaringan normal) yaitu terlihat adanya 1 *band* (pita) DNA dibandingkan dengan marker terletak pada 300 pasang basa (*base pair*) atau 300 bp.

Pemeriksaan PCR pada gen p53 ekson 7 yang optimal baik pada sampel KSSRM maupun kontrol didapatkan melalui hasil optimasi PCR ekson 7<sup>1</sup> yang akan digunakan sebagai *template* primer p53 ekson 7<sup>2</sup>. Pereaksi yang digunakan sebagai berikut: PCR *Ready to go*, 2 µl DNA sampel KSSRM, 1 µl primer 1 ekson 7<sup>1</sup>, 1 µl primer 2 ekson 7<sup>1</sup>, 21 µl dH<sub>2</sub>O dalam tabung *ependorf* dan dilakukan vorteks. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol. Tahap berikutnya adalah program PCR dengan menggunakan mesin PCR yaitu denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 61°C selama 2 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 62°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 2 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit setelah didapatkan hasil optimasi PCR ekson 7<sup>1</sup> 1 pita DNA, kemudian hasil produk optimasi PCR ekson-7<sup>1</sup> sebanyak 5 µl sebagai *template* untuk p53 ekson 7<sup>2</sup> yaitu dengan menambahkan 1 µl primer 1 ekson 7<sup>2</sup>, 1 µl primer 2 ekson 7<sup>2</sup>, PCR *Ready to go*, 18 µl dH<sub>2</sub>O. Program PCR untuk p53 ekson 7<sup>2</sup> yaitu dilakukan denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 63°C selama 2 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 64°C selama 1 menit, *extension* 72°C selama 2 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit, maka didapatkan analisis sampel DNA produk PCR ekson 7. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol. Tahap selanjutnya

dilakukan elektroforesis gel agarose 2% dengan voltase konstan 100 volt maka didapatkan hasil sampel DNA produk PCR ekson 7 yang optimum baik pada sampel KSSRM maupun sampel kontrol yaitu terlihat adanya 1 pita DNA dibandingkan dengan marker terletak pada 300 bp.

Pemeriksaan PCR pada gen p16 ekson 1 yang optimal didapatkan dengan menggunakan pereaksi sebagai berikut: PCR *Ready to go*, 2 µl DNA sampel KSSRM, 1µl primer 1 p16 ekson 1, 1µl primer 2 p16 ekson 1, 21 µl dH<sub>2</sub>O dalam tabung *ependorf* dan dilakukan vorteks. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol, kemudian dilakukan program PCR dengan menggunakan mesin PCR yaitu tahap denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 69°C selama 3 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan dengan denaturasi 94°C selama 35 detik, *annealing* 70°C selama 30 detik, *extension* 72°C selama 1 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol, maka didapatkan analisis sampel DNA produk p16 ekson 1 dan kontrol dengan elektroforesis gel agarose 2% dengan voltase konstan 100 volt. Hasil sampel DNA produk PCR p16 ekson 1 dan kontrol yang optimum yaitu terlihat adanya 1 pita DNA sesuai dengan marker dengan ukuran 125 bp.

Pemeriksaan PCR pada gen p16 ekson 2 yang optimal didapatkan dengan menggunakan pereaksi sebagai berikut: PCR *bead / PCR Ready to go*, 2µl DNA sampel KSSRM, 1µl primer 1 p16 ekson 2, 1µl primer 2 p16 ekson 2, 21 µl dH<sub>2</sub>O dalam tabung *ependorf* dan dilakukan vorteks. Prosedur yang sama juga dilakukan



pada kelompok kontrol. Kemudian dilakukan program PCR dengan menggunakan mesin PCR yaitu denaturasi 95°C selama 4 menit, *annealing* 65°C selama 3 menit, *extension* 72°C selama 3 menit 1 kali siklus dilanjutkan denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 66°C selama 45 detik, *extension* 72°C selama 1 menit 30 kali siklus, *ekstra extension* 72°C selama 5 menit. Prosedur yang sama juga dilakukan pada kelompok kontrol, maka didapatkan analisis sampel DNA produk p16 ekson 2 dengan elektroforesis gel agarose 2% dengan voltase konstan 100 volt. Selanjutnya diperoleh sampel DNA hasil produk PCR p16 ekson 2 yang optimum baik pada sampel KSSRM maupun sampel kontrol yaitu terlihat adanya 1 pita DNA sesuai dengan marker dengan ukuran 307 bp.

Analisis SSCP untuk DNA hasil produk PCR gen p53 (ekson 5, 7) serta p16 (ekson 1, 2) sejumlah 40 sampel yang dibagi menjadi masing – masing 10 sampel dengan setiap kelompok kontrolnya. Kemudian dilakukan modifikasi sebagai berikut yaitu 5 µl DNA hasil PCR produk PCR gen p53 dan p16 yang optimum, masing–masing diberi nomor sedangkan kelompok kontrol diberi nomor atau tanda K. Selanjutnya ditambahkan 10 µl formamid sebagai *loading buffer* sehingga didapatkan 15 µl larutan denaturasi dalam *ependorf* kemudian di vortex dan dilakukan sentrifus. Sesudah itu dilanjutkan denaturasi dalam air mendidih 100°C selama 10 menit, kemudian didinginkan segera dengan larutan nitrogen cair - 80°C selama 5–10 menit. Masing-masing tabung PCR hasil produk DNA gen p53 dengan masing- masing hasil produk DNA kontrolnya sebanyak 15 µl dari campuran tersebut ditambahkan *loading buffer* dan selanjutnya dilakukan analisis dengan menggunakan elektroforesis gel akrilamid non denaturasi 12% pada suhu ruangan



selama 5 jam dengan voltase konstan 150°C kemudian dilakukan pengecatan sampel DNA produk PCR dengan pengecatan perak nitrat dengan prosedur sebagai berikut: fiksasi dalam larutan 7,5% asam asetat selama 30 menit. Cuci dengan dH<sub>2</sub>O sebanyak 3 kali selama 5 menit. Pengecatan perak nitrat dengan 100 ml larutan perak yang terdiri dari 1,5g/l AgNO<sub>3</sub> dan 0,056% formaldehid selama 45 menit. Kemudian dicuci dengan dH<sub>2</sub>O selama 15 detik dan selanjutnya dilakukan *image development* dengan larutan developer yang terdiri dari 30g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,056% formaldehid, 2 mg/l sodium tiosulfat selama 2-5 menit. *Stop solution* dengan menggunakan larutan fiksasi yaitu 7,5% asam asetat (-4°C) selama 30 detik sampai 5 menit. Prosedur yang sama juga dilakukan pada setiap kelompok gen p16 serta kelompok kontrolnya sehingga hasilnya menunjukkan migrasi konformasi lipat dari pita DNA. Hasil analisis SSCP produk PCR gen p53 ekson 5 dan 7 serta p16 ekson 1 dan 2 menunjukkan pola migrasi atau adanya perubahan mobilitas hasil konformasi lipat polimorfisme DNA untai tunggal bisa berupa 2 pita (*band*) yang tidak sama posisinya dengan 2 pita DNA hasil SSCP kontrolnya menunjukkan adanya mutasi homozigot. Keadaan tersebut dinilai dengan positif (+) atau mutasi positif (skor 1), jika hasilnya 3 pita atau 4 pita DNA baik pada gen p53 ekson 5, 7 dan gen p16 ekson 1, 2 yang tidak sama posisinya dengan 2 pita DNA hasil SSCP kontrolnya menunjukkan indikasi adanya mutasi heterozigot yang dinilai dengan positif (+) atau skor 1. Apabila hasilnya 2 *band* pada p53 ekson 5, 7 dan p16 ekson 1, 2 yang posisinya sama dengan 2 *band* pada kontrol hasil PCR-SSCP maka menunjukkan bahwa tidak adanya mutasi dinilai dengan negatif (-) atau skor 0. Dengan demikian deteksi mutasi p53 dan p16 yang diperoleh masing masing 40 data deteksi mutasi positif dan negatif sedangkan pengamatan pada 16 sampel

kelompok kontrol semua tidak didapatkan mutasi (mutasi negatif) atau skor 0, sehingga tidak dilakukan uji analisis terhadap kelompok kontrol. Data dari hasil pengamatan mutasi gen dengan metode PCR-SSCP kemudian dapat ditentukan pada seluruh sampel penelitian yaitu mutasi dan tidak adanya mutasi pada GST p53 yang didapat dari hasil mutasi pada ekson 5 dan atau ekson 7 serta GST p16 yang didapatkan dari hasil mutasi pada ekson 1 dan atau ekson 2, selanjutnya dari data mutasi GST p53 dan GST p16 dikumpulkan dengan hasil data gambaran klinis yaitu umur, perokok/penginang, stadium klinis dan data gambaran HPA yaitu KSSRM diferensiasi baik dan jelek.

#### 4.11 Cara Analisis Data

Analisis terhadap data *cross sectional* dilakukan dengan menggunakan program SPSS versi 11. Data hasil pengamatan mutasi gen dengan metode PCR-SSCP pada seluruh sampel penelitian yaitu untuk mengetahui adanya mutasi dan tidak adanya mutasi pada GST p53 (ekson 5, 7) dan GST p16 (ekson 1, 2) dengan data status gambaran klinis seperti umur, perokok/penginang, stadium klinis dan data gambaran HPA yaitu KSSRM diferensiasi baik dan jelek.

Data penelitian observasional ini menggunakan beberapa metode statistik untuk analisis data guna pengujian hipotesis penelitian yang telah diajukan yaitu :

1. Uji beda menggunakan *Cochran's Q Test* untuk menguji kemaknaan perbedaan mutasi antara gen supresor tumor p53 yang didapatkan dari hasil mutasi gen p53 ekson 5 dan atau ekson 7 dan mutasi gen p16 yang didapatkan dari mutasi gen p16 ekson 1 dan atau ekson 2 pada KSSRM.
2. Uji asosiasi atau hubungan menggunakan *Contingency coefficient* untuk melihat kuat tidaknya hubungan antara parameter gambaran klinis yaitu

umur, perokok/penginang, stadium klinis dan histopatologis yaitu KSSRM diferensiasi sel baik dan jelek dengan mutasi gen supresor tumor p53 yang didapatkan dari hasil mutasi gen p53 ekson 5 dan atau ekson 7 dan mutasi gen p16 yang didapatkan dari mutasi gen p16 ekson 1 dan atau ekson 2 pada KSSRM



## BAB 5

### HASIL DAN ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil optimasi PCR GST p53 dan p16 pada KSSRM

Hasil optimasi PCR GST p53 dan p16 KSSRM didapat melalui hasil optimasi 40 sampel GST p53 pada ekson 5, 40 sampel GST ekson 7 dan 16 sampel kontrolnya. Sementara optimasi PCR GST p16 didapat melalui hasil optimasi GST p16 pada 40 sampel GST p16 ekson 1, 40 sampel GST p16 ekson 2 dan 16 sampel kontrolnya sehingga menghasilkan produk PCR yang diharapkan.

Hasil optimasi PCR GST p53 pada ekson 5 dan 7 didapatkan 1 pita DNA sesuai dengan hasil produk PCR GST p53 ekson 5 dan 7 dengan amplifikasi sebesar 300 bp (*base pair*).

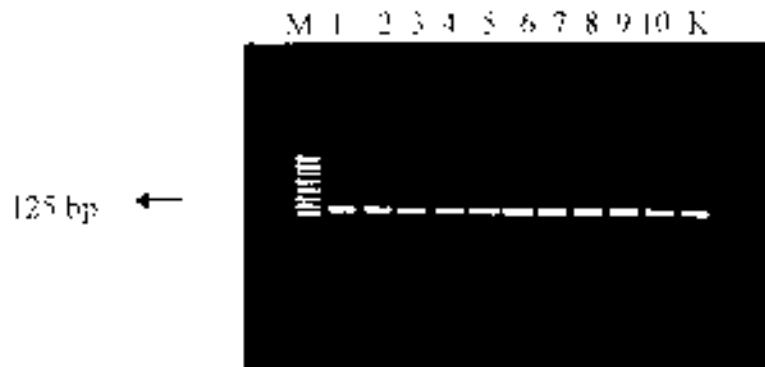
Hasil optimasi GST p53 KSSRM ekson 5 sampel No1 sampai No 10 dan kontrolnya, seperti terlihat pada Gambar 5.1



Gambar 5.1 Hasil produk PCR GST p53 ekson 5 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol (K) menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 300 bp sesuai dengan marker (M).

Hasil optimasi PCR GST p16 ekson 1 didapatkan 1 pita DNA dengan ukuran 125 bp sesuai dengan hasil produk PCR GST p16 ekson 1 dengan

amplifikasi sebesar 125 bp. Hasil amplifikasi GST p16 ekson 1, sampel No 1 sampai No 10 dan kontrolnya, seperti terlihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Hasil produk optimasi PCR GST p16 ekson 1 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol (K) menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 125 bp sesuai dengan marker (M) (visualisasi dengan pewarnaan *ethidium bromide*)

Hasil optimasi PCR GST p16 ekson 2 didapatkan 1 pita DNA dengan ukuran 307 bp sesuai hasil produk PCR p16 ekson 2 dengan amplifikasi sebesar 307 bp. Hasil optimasi PCR GST p16 ekson 2 sampel No 1 sampai No 10 dan kontrolnya, terlihat pada Gambar 5.3



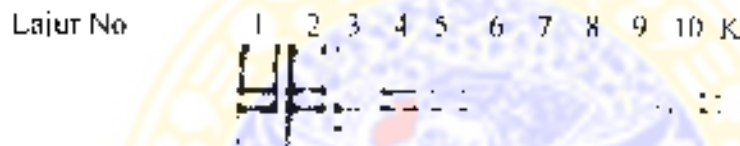
Gambar 5.3 Hasil produk PCR GST p16 ekson 2 sampel No1 sampai No 10 dan kontrol menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 307 bp sesuai dengan marker (visualisasi dengan pewarnaan *ethidium bromide*)

Secara keseluruhan hasil optimasi PCR 40 sampel GST p53 dan 40 sampel GST p16 dan 16 sampel kontrolnya dapat dilihat pada lampiran 1 sampai dengan 4



### 5.1.2 Hasil PCR-SSCP GST p53 dan p16 pada KSSRM

Hasil PCR-SSCP 40 sampel GST p53 dan 40 sampel GST p16 pada KSSRM dibandingkan dengan 16 sampel kontrolnya dengan pengecatan perak nitrat menunjukkan mutasi yang ditandai dengan adanya perbedaan pola migrasi konformasi lipat polimorfisme 2 atau 4 pita DNA sampel dibandingkan dengan 2 pita DNA kontrol. Sementara yang tidak mutasi ditandai dengan tidak adanya perbedaan posisi 2 pita DNA sampel dengan 2 pita DNA kontrolnya. Perbedaan pola migrasi bisa berupa 2 pita DNA yang letaknya berbeda dengan kontrol ini menunjukkan mutasi homozigot, seperti terlihat pada Gambar 5.4



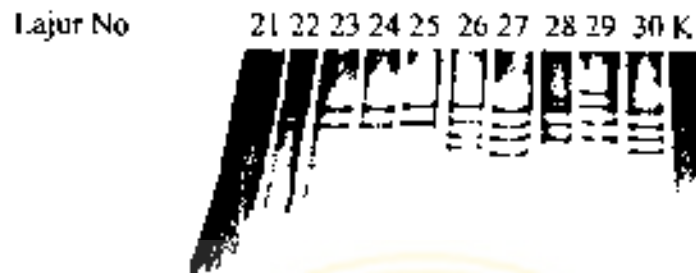
Gambar 5.4 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 5 lajur No 3 menunjukkan adanya mutasi homozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

Beberapa sampel KSSRM GST p53 terlihat 4 pita DNA yang letaknya berbeda dengan 2 pita DNA kontrol merupakan indikasi adanya mutasi heterozigot, seperti terlihat pada Gambar 5.5



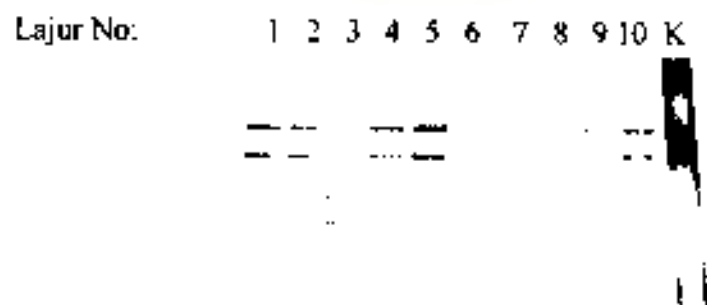
Gambar 5.5 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 7 lajur No 3, 6, 8, 9 dan 10 menunjukkan adanya mutasi heterozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

Beberapa sampel KSSRM GST p53 ekson 7 terlihat posisi 2 pita DNA yang sama dengan dengan 2 pita DNA kontrolnya yang menunjukkan indikasi bahwa beberapa sampel tersebut tidak terdapat mutasi, seperti terlihat pada Gambar 5.6



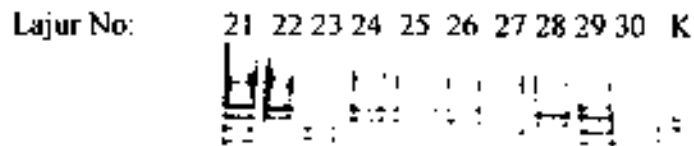
Gambar 5.6 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 7 sampel lajur No 22, 23, 24, 25 tidak terdapat adanya mutasi. (Visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

Hasil PCR -- SSCP GST p16 dengan pengecatan perak nitrat menunjukkan adanya mutasi yang ditandai dengan adanya perbedaan pola migrasi konformasi lipat polimorfisme pita DNA antara sampel mutasi GST p16 dengan sampel jaringan normal sebagai kontrol. Perbedaan pola migrasi bisa berupa 2 pita DNA yang letaknya berbeda dengan kontrol ini menunjukkan adanya mutasi homozigot, seperti terlihat pada Gambar 5.7



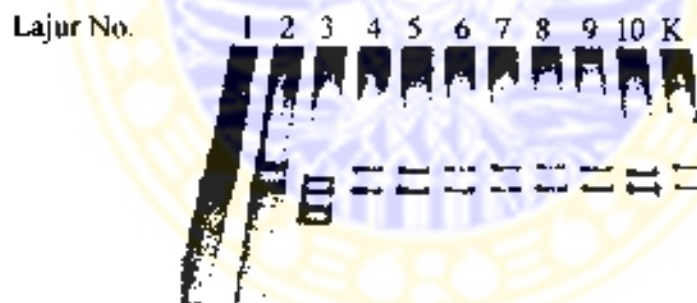
Gambar 5.7 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 1 sampel dengan lajur No 3 dan 6 menunjukkan mutasi homozigot (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

Beberapa sampel KSSRM (GST p16 terlihat 4 pita DNA yang posisinya tidak sama dengan letak 2 pita DNA kontrol yang merupakan indikasi adanya mutasi heterozigot, seperti terlihat pada Gambar 5.8



Gambar 5.8 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 1 sampel lajur No 21 dan 29 menunjukkan mutasi heterozigot. (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

Beberapa sampel KSSRM GST p16 terlihat posisi 2 pita DNA yang sama dengan 2 pita DNA kontrolnya yang menunjukkan indikasi bahwa beberapa sampel tersebut tidak terdapat mutasi, seperti terlihat pada Gambar 5.9



Gambar 5.9 Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 2 sampel lajur No 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 tidak terdapat mutasi (visualisasi pengecatan perak nitrat)

Secara keseluruhan hasil 40 sampel PCR-SSCP GST p53 dan 40 sampel GST p16 pada KSSRM serta kontrolnya dengan visualisasi pengecatan perak nitrat dapat dilihat pada lampiran 5 sampai dengan 8.

### 5.1.3 Data hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

Hasil deteksi mutasi 40 sampel GST p53 dan 40 sampel pada GST p16 pada KSSRM dibandingkan dengan kelompok kontrolnya, didapatkan mutasi GST p53 sebesar 28/40 (70%) menunjukkan mutasi homozigot 2/29 (6,8 %) dan heterozigot 27/29 (93,2%). Sementara GST p53 yang tidak mutasi sebesar 12/40 (30%) kemudian GST p53 ekson 5 didapatkan mutasi sebesar 11 /40 (27,5%) menunjukkan mutasi homozigot 2/11 (18,2%), heterozigot 9/11 (81,8%) sedangkan yang tidak mutasi sebesar 29/40 (72,5 %). Pada p53 ekson 7 ditemukan mutasi sebesar 22/40 (55%) menunjukkan mutasi heterozigot 22/22 (100%) sedangkan yang tidak mutasi sebesar 18/40 (45%).

Hasil GST p16 terjadi mutasi sebesar 14/40 (35%) menunjukkan mutasi homozigot 13/20 (65%), heterozigot 7/20 (35%) sedangkan yang tidak mutasi sebesar 26/40 (65%). Pada GST p16 ekson 1 didapatkan mutasi sebesar 14/40 (35%) menunjukkan mutasi homozigot 10/14 (71,4%), heterozigot 4/14 (28,6%) sedangkan yang tidak mutasi sebesar 26/40 (65%). Sementara GST p16 ekson 2 didapatkan mutasi sebesar 6/40 (15%) menunjukkan mutasi homozigot 4/6 (66,7 %) dan heterozigot 2 (33,3%), sedangkan yang tidak mutasi sebesar 34/40 (85%), dapat dilihat pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Hasil PCR-SSCP GST p53 dan p16 pada KSSRM

KSSRM	Kejadian Mutasi (%)						
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	Total	Homozigot	Heterozigot	Total
GST	p53	28 (70%)	12 (30%)	40	2 (6,8%)	27 (93,2%)	29
	p16	14 (35%)	26 (65%)	40	13 (65%)	7 (35%)	20
p53	E 5	11 (27,5%)	29 (72,5%)	40	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11
	E 7	22 (55 %)	18 (45%)	40	0 (0%)	22 (100%)	22
p16	E1	14 (35 %)	26 (65%)	40	10 (71,4%)	4 (28,6%)	14
	E2	6 (15 %)	34 (85%)	40	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6

Hasil deteksi mutasi pada 16 sampel kelompok kontrol didapatkan mutasi 0 (0%) atau seluruh kelompok kontrol tidak didapatkan mutasi 100% sehingga hanya digunakan sebagai pembandingan dalam teknis laboratorium hasil PCR-SSCP untuk menentukan ada tidaknya mutasi p53 (ekson 5 dan atau ekson 7) dan p16 mutasi (ekson 1 dan atau ekson 2) sehingga tidak dilakukan analisis hasil penelitian. Data keseluruhan hasil deteksi mutasi KSSRM GST p53 dan p16 yang positif (+) diberi skor 1, negatif (-) diberi skor 0 dan kontrol serta data klinikohistopatologis, dapat dilihat pada hasil data di lampiran 9.

#### **5.1.4 Data hasil penelitian gambaran klinis dan HPA dengan kejadian mutasi GST p53 pada KSSRM.**

Hasil penelitian 40 penderita KSSRM dengan gambaran klinis didapatkan data status klinis yang terdiri dari umur, perokok/penginang, stadium klinis dan HPA dengan KSSRM diferensiasi baik dan jelek. Pada 40 penderita KSSRM ditemukan 11 kasus dengan umur 40-50 tahun dengan mutasi p53 sebesar 4/11 (36,4%), ekson 5 sebesar 3/11 (27,3%), ekson 7, 2/11 (18,2%). Pada 40 penderita KSSRM umur 51-60 tahun ditemukan 20 kasus dengan mutasi p53 sebesar 15/20 (75%), ekson 5; 3/20 (15%), ekson 7; 12/20 (60%) sedangkan 40 penderita KSSRM umur lebih dari 60 tahun didapatkan 9 kasus dengan mutasi p53 sebesar 9/9 (100%), ekson 5; 5/9 (55,6%), ekson 7; 8/9 (88,9%). Pada 40 penderita KSSRM perokok/pengunyah sirih (penginang) ditemukan 28 kasus dengan mutasi GST p53 sebesar 23/28 (82,1%), ekson 5; 9/28 (32,1%), ekson 7; 19/28 (67,9%) sedangkan 40 penderita KSSRM tidak merokok ditemukan 12 kasus dengan mutasi GST p53 sebesar 5/12 (41,7%), ekson 5; 2/12 (16,7%), ekson 7; 3/12 (25%). Pada 40 penderita KSSRM dengan stadium klinis I sampai stadium IV didapatkan 14 kasus KSSRM



dengan stadium klinis I-II dan 26 KSSRM dengan stadium klinis III-IV. Pada 14 kasus KSSRM stadium klinis I-II didapatkan 6 kasus dengan mutasi p53 sebesar 6/14 (42,9%), dengan mutasi p53 ekson 5 sebesar 2/14 (14,3%) dan ekson 7; 4/14 (28,6%). Pada 26 kasus KSSRM dengan stadium klinis III-IV didapatkan 22 kasus dengan mutasi p53 sebesar 22/26 (84,6%), dengan mutasi p53 ekson 5 sebesar 9/26 (34,6%) dan ekson 7; 18/26 (69,2%). Pada 40 penderita KSSRM dengan HPA diferensiasi baik didapatkan 20 kasus dengan mutasi p53 sebesar 12/20 (60%), ekson 5; 2/20 (10%) dan ekson 7; 10/20 (50%). Pada 40 penderita KSSRM dengan HPA diferensiasi jelek didapatkan 20 kasus dengan mutasi p53 sebesar 16/20 (80%), ekson 5; 9/20 (45%) dan ekson 7; 12/20 (60%). Data hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil penelitian gambaran klinis dan HPA dengan kejadian mutasi GST p53 pada KSSRM

Parameter	Mutasi p53 (%)		Mutasi p53 ekson 5		Mutasi p53 ekson 7		
	Mutasi (-)	Tdk Mutasi (-)	Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	36,4	63,6	27,3	72,7	18,2	81,8
	51-60 th	75	25	15	85	60	40
	> 60 th	100	0	55,6	44,4	88,9	11,1
Rokok/ Nginang	Ya	82,1	17,9	32,1	67,9	67,9	32,1
	Tidak	41,7	58,3	16,7	83,3	25	75
St. Klinis	I-II	42,9	57,1	14,3	85,7	28,6	71,4
	III-IV	84,6	15,4	34,6	65,4	69,2	30,8
HPA	D. Baik	60	40	10	90	50	50
	D. Jelek	80	20	45	55	60	40

Keterangan: D. Baik = Diferensiasi Baik, D. Jelek = Diferensiasi Jelek  
St. Klinis = Stadium Klinis

### 5.1.5 Data hasil penelitian gambaran klinis dan HPA dengan kejadian mutasi GST p16 pada KSSRM

Data hasil penelitian 40 penderita KSSRM dengan parameter gambaran klinis yaitu umur, perokok/penginang, stadium klinis dan HPA dengan KSSRM diferensiasi baik dan jelek, ditemukan 11 penderita umur 40-50 tahun dengan mutasi p16 sebesar 4/11 (36,4%), ekson 1 sebesar 4/11 (36,4%), ekson 2, 4/11 (36,4%). Pada 40 penderita KSSRM umur 51-60 tahun ditemukan 20 kasus dengan mutasi p16 sebesar 7/20 (35%), ekson 1; 7/20 (35%), ekson 2; 2/20 (10%) sedangkan 40 penderita KSSRM umur lebih dari 60 tahun didapatkan 9 kasus dengan mutasi p16 sebesar 3/9 (33,3%), ekson 1; 3/9 (33,3%), ekson 2; 0/9 (0%). Pada 40 penderita KSSRM perokok /pengunyah sirih (penginang) ditemukan 28 kasus dengan mutasi GST p16 sebesar 12/28 (42,9%), ekson 1; 12/28 (42,9%), ekson 2; 6/28 (21,4%) sedangkan 40 penderita KSSRM tidak merokok ditemukan 12 kasus dengan mutasi GST p16 sebesar 2/12 (16,7%), ekson 1; 2/12 (16,7%), ekson 2; 0/12 (0%). Pada 40 penderita KSSRM didapatkan 14 kasus KSSRM dengan stadium klinis I-II dan 26 kasus KSSRM dengan stadium klinis III-IV. Pada 14 kasus KSSRM stadium klinis I-II didapatkan 4 kasus dengan mutasi p16 sebesar 4/14 (28,6%), dengan mutasi p16 ekson 1 sebesar 4/14 (28,6%) dan ekson 2; 2/14 (14,3%). Pada 26 kasus KSSRM dengan stadium klinis III-IV didapatkan 10 kasus mutasi p16 sebesar 10/26 (38,5%), dengan mutasi p16 ekson 1 sebesar 10/26 (38,5%) dan ekson 2; 4/26 (15,4%). Pada 40 penderita KSSRM dengan HPA diferensiasi baik didapatkan 20 kasus dengan mutasi p16 sebesar 4/20 (20%), ekson 1; 4/20 (20%) dan ekson 2; 2/20 (10%). Pada 40 penderita KSSRM dengan HPA diferensiasi jelek didapatkan

20 kasus dengan mutasi p16 sebesar 10/20 (50%), ekson 1; 10/20 (50%) dan ekson 2; 4/20 (20%). Data hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 5.3

**Tabel 5.3** Hasil penelitian gambaran klinis dan HPA dengan kejadian mutasi GST p16 pada KSSRM.

Parameter		Mutasi p16 (%)		Mutasi p16 ekson 1		Mutasi p16 ekson 2	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)
Umur	40-50 th	36,4	63,6	36,4	63,6	36,4	63,6
	51-60 th	35	65	35	65	10	90
	> 60 th	33,3	66,7	33,3	66,7	0	100
Rokok/ Ngunang	Ya	42,9	57,1	42,9	57,1	21,4	78,6
	Tidak	16,7	83,3	16,7	83,3	0	100
St.Klinis	I-II	28,6	71,4	28,6	71,4	14,3	85,7
	III-IV	38,5	61,5	38,5	61,5	15,4	84,6
HPA	D.Baik	20	80	20	80	10	90
	D.Jelek	50	50	50	50	20	80

Keterangan: D. Baik = Diferensiasi Baik, D. Jelek = Diferensiasi Jelek  
St. Klinis = Stadium Klinis

## 5.2 Analisis Hasil Penelitian

Analisis hasil penelitian ditujukan untuk menilai perbedaan hasil deteksi mutasi gen yang terjadi pada KSSRM berupa hasil deteksi mutasi yang terjadi pada GST p53 dan p16. Hasil deteksi mutasi GST p53 yaitu mutasi yang terjadi pada ekson 5 dan atau ekson 7 sedangkan mutasi GST p16 yaitu mutasi yang terjadi pada ekson 1 dan atau ekson 2, kemudian menilai hubungan antara mutasi GST p53 dan GST p16 dengan gambaran klinis yaitu umur, perokok/pengunang, stadium klinis dan gambaran HPA yaitu KSSRM diferensiasi baik dan jelek. Pada kelompok kontrol tidak dilakukan analisis hasil data penelitian karena hasil deteksi mutasi 26 sampel

kelompok kontrol tidak didapatkan mutasi dan hanya digunakan dalam teknis laboratorium untuk menentukan ada tidaknya mutasi. Dalam penulisannya pada setiap butir substansi hasil penelitian disajikan dalam bentuk tabel atau gambar kemudian diikuti dengan analisisnya

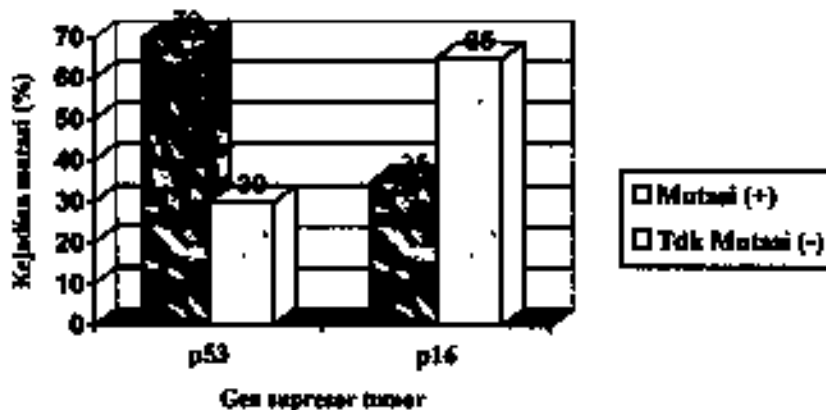
### 5.2.1 Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

Uji beda yang digunakan adalah *Cochran's Q Test* untuk menilai adanya perbedaan mutasi antara GST p53 dan p16 pada KSSRM, perbedaan antara mutasi GST p53 ekson 5 dan ekson 7 pada KSSRM dan perbedaan antara mutasi GST p16 ekson 1 dan ekson 2 pada KSSRM.

Tabel 5.4 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

Parameter		Jenis Uji	Nilai	p (%)
Mutasi KSSRM	GST p53	<i>Cochran's Q Test</i>	9,825	0,002
	GST p16			

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kejadian mutasi antara GST p53 dan p16 dengan kejadian mutasi pada KSSRM dengan nilai = 9,825 dan p 0,002 (lihat Tabel 5.4).



Grafik 5.1 Hasil proporsi mutasi GST p53 yang lebih tinggi dari GST p16 pada KSSRM.

Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM menunjukkan bahwa mutasi GST p53 (70%) menunjukkan proporsi lebih tinggi ( $p=0,002$ ) dibandingkan dengan proporsi mutasi GST p16 (35%), dapat dilihat Grafik 5.1

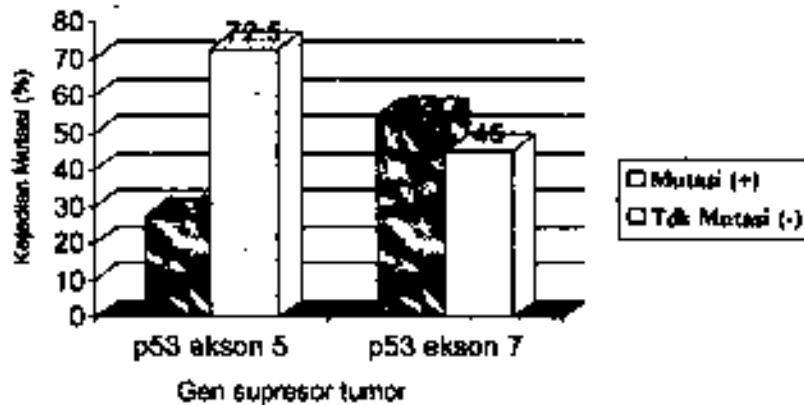
#### 5.2.1.1 Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 dan 7 pada KSSRM

Tabel 5.5 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 ekson 5 dan 7 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	Nilai	P (sig)
Mutasi KSSRM	GST p53 ekson 5	Cochran's Q Test	6,241	0,012
	GST p53 ekson 7			

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kejadian mutasi antara GST p53 ekson 5 dan ekson 7 sebanyak dengan kejadian mutasi pada KSSRM dengan nilai = 6,241 dan  $p=0,012$  (lihat Tabel 5.5).





Grafik 5.2 Hasil proporsi mutasi GST p53 ekson 7 lebih tinggi dari GST p53 ekson 5 pada KSSRM

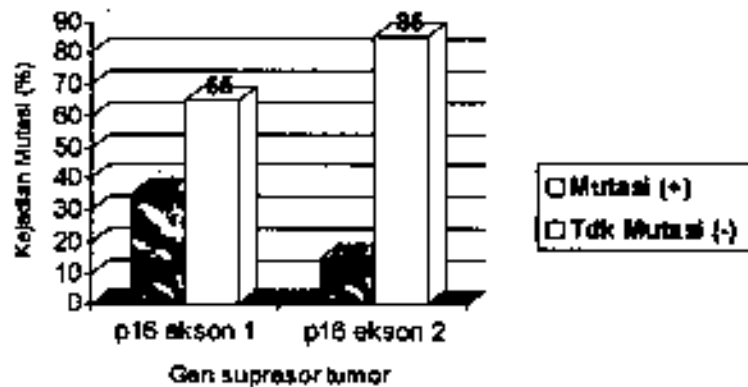
Hasil uji beda deteksi mutasi GST p53 ekson 5 dan ekson 7 pada KSSRM menunjukkan bahwa mutasi GST p53 ekson 7 (55%) menunjukkan proporsi lebih tinggi ( $p=0,012$ ) dibandingkan dengan proporsi mutasi GST p53 ekson 5 (27,5%), dapat dilihat Grafik 5.2

#### 5.2.1.2 Perbedaan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 dan 2 pada KSSRM

Tabel 5.6 Hasil uji beda deteksi mutasi GST p16 ekson 1 dan 2 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	Nilai	P (sig)
Mutasi KSSRM	GST p16 ekson 1	<i>Cochran's Q Test</i>	4,267	0,039
	GST p16 ekson 2			

Terdapat perbedaan yang signifikan antara kejadian mutasi antara GST p16 ekson 1 dan ekson 2 dengan kejadian mutasi pada KSSRM dengan nilai - 4,267 dan  $p=0,039$  ; dapat dilihat pada Tabel 5.6



**Grafik 5.3** Hasil proporsi mutasi GST p16 ekson 1 lebih tinggi dari GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Hasil uji beda deteksi mutasi GST p16 ekson 1 dan ekson 2 pada KSSRM menunjukkan bahwa mutasi GST p16 ekson 1 (35%) menunjukkan proporsi lebih tinggi ( $p=0,039$ ) dibandingkan dengan proporsi mutasi GST p16 ekson 2 (15%), dapat dilihat pada Grafik 5.3

### 5.2.2 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

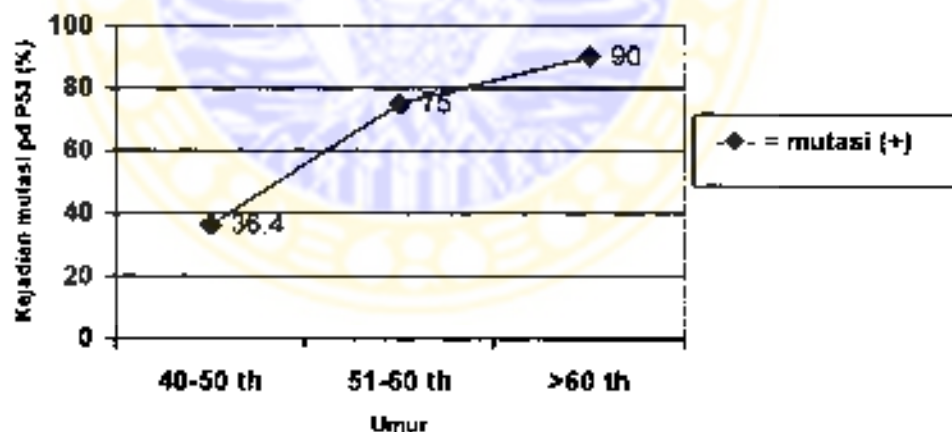
Uji hubungan antara umur dengan deteksi mutasi GST p53 dan p16 menggunakan *Contingency coefficient* yang dikelompokkan menjadi umur 40–50 th, 51–60 th dan lebih dari 60 th dengan mutasi p53; p53 ekson 5, p53 ekson 7 dan kelompok umur 40–50 th, 51–60 th dan lebih dari 60 th dengan mutasi p16; p16 ekson 1 dan p16 ekson 2.

### 5.2.2.1 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM

Tabel 5.7 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 pada KSSRM

Variabel	Jenis Uji	df	Nilai	p (sig.)
Umur 40-50 th 51-60 th > 60 th	Mutasi p53 <i>Contingency coefficient</i>	2	0,448	0,007

Terdapat hubungan signifikan dengan nilai = 0,448 dan  $p = 0,007$  antara umur dengan mutasi GST p53 pada KSSRM, dapat dilihat pada Tabel 5.7



Grafik 5.4 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 pada KSSRM

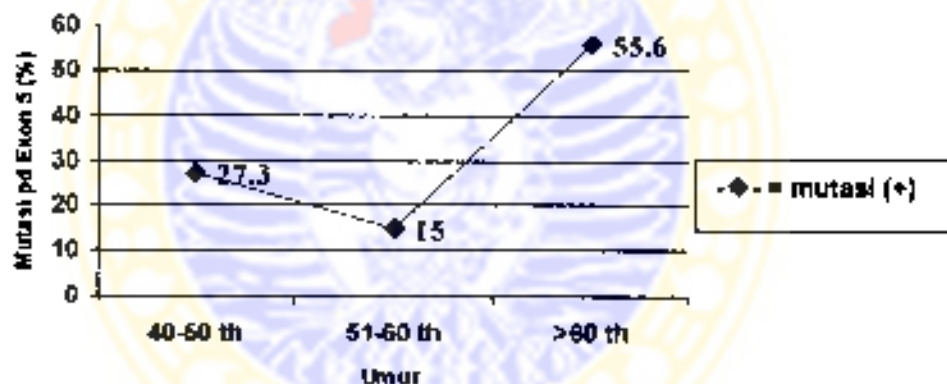
Hasil uji asosiasi atau hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 KSSRM menunjukkan pola kecenderungan semakin meningkat dan kuatnya hubungan ( $p = 0,007$ ) yaitu dengan bertambahnya umur diikuti dengan peningkatan kejadian mutasi, dapat dilihat pada Grafik 5.4

### 5.2.2.1.1 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Tabel 5.8 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	p (sig.)
Umur	40 - 50 th 51 - 60 th > 60 th	<i>Congency coefficient</i>	2	0,337	0,077

Tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,337$  dan  $p=0,077$  antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM, lihat Tabel 5.8



Grafik 5.5 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

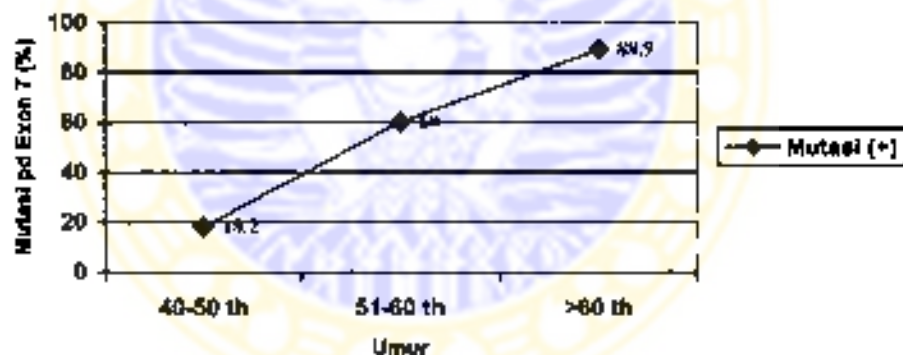
Hasil uji hubungan kelompok umur dan mutasi GST p53 ekson 5 menunjukkan pola kelompok umur yang tidak konsisten ( $p=0,077$ ) dengan peningkatan kejadian mutasi dan semakin bertambahnya umur, terlihat ada penurunan sedikit tajam kejadian mutasi GST p53 ekson 5 pada kelompok umur 51-60 th (15%), dapat dilihat pada Grafik 5.5. Seharusnya pola yang didapat seperti hasil uji hubungan kelompok umur dengan mutasi GST p53.

### 5.2.2.1.2 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Tabel 5.9 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Variabel	Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Umur 40 -50 th 51 -60 th > 60 th	Mutasi p53 ekson 7 <i>Contingency coefficient</i>	2	0,454	0,006

Terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,454$  dan  $p = 0,006$  antara umur dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM, lihat pada Tabel 5.9



Grafik 5.6 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p53 KSSRM ekson 7 menunjukkan pola kecenderungan meningkat tajam ( $p = 0,006$ ) yaitu dengan bertambahnya umur diikuti dengan peningkatan kejadian mutasi, dapat dilihat pada Grafik 5.6

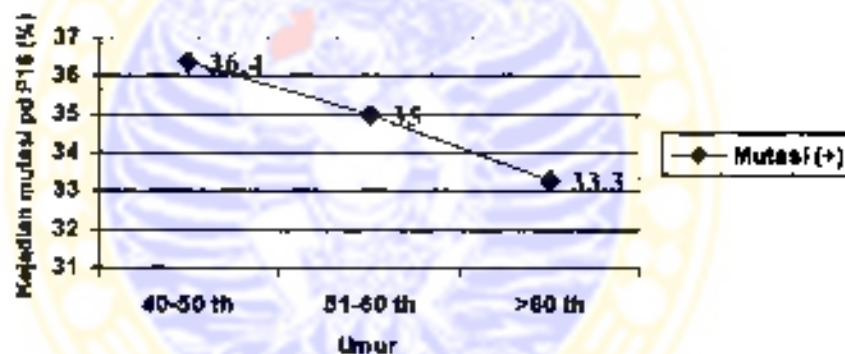


### 5.2.2.2 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM

Tabel 5.10 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Umur	40-50 th 51-60 th > 60 th	Contingency coefficient	2	0,022	0,990

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,022 dan  $p = 0,990$  antara umur dengan mutasi GST p16 pada KSSRM, lihat Tabel 5.10



Grafik 5.7 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 pada KSSRM

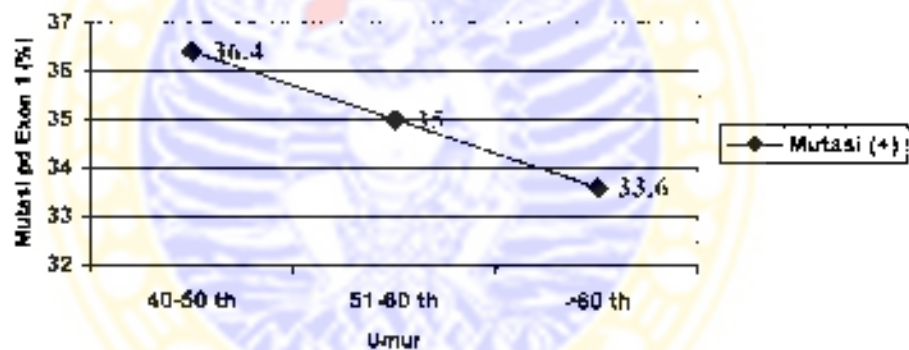
Hasil uji hubungan kelompok umur dan mutasi GST p16 menunjukkan pola kecenderungan sedikit menurun tajam yang tidak sesuai ( $p = 0,990$ ) dengan peningkatan kejadian mutasi dan semakin bertambahnya umur, dapat dilihat pada Grafik 5.7. Seharusnya pola yang didapat seperti hasil uji hubungan kelompok umur dengan mutasi GST p16.

### 5.2.2.2.1 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Tabel 5.11 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 1 KSSRM

Variabel	Jenis Uji	df	Nilai	p (sig.)
Umur 40-50 th 51-60 th 60 th	Mutasi p16 ekson 1 <i>Contingency coefficient</i>	2	0,022	0,990

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,022$  dan  $p = 0,990$  antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM, lihat Tabel 5.11



Grafik 5.8 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

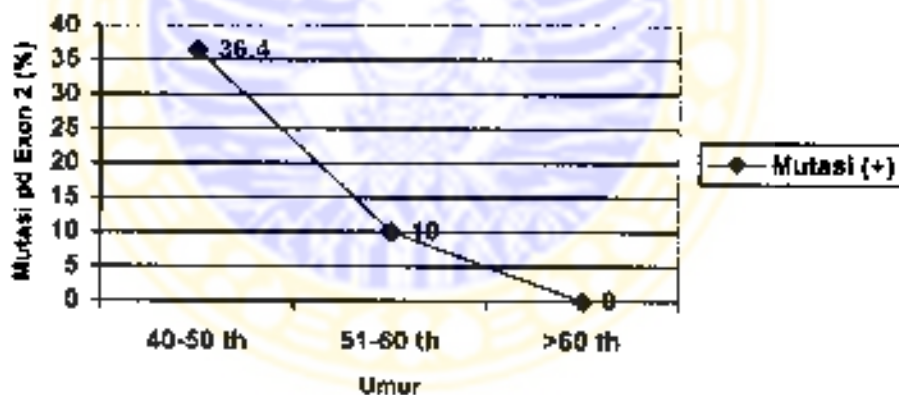
Hasil uji hubungan kelompok umur dan mutasi GST p16 ekson 1 menunjukkan pola kecenderungan sedikit menurun tajam yang tidak sesuai ( $p=0,990$ ) dengan peningkatan kejadian mutasi dan semakin bertambahnya umur, dapat dilihat pada Grafik 5.8

### 5.2.2.2.2 Hubungan antara umur dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Tabel 5.12 Hasil uji hubungan antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Varabel	Jenis Uji	Nilai	p (sig)
Umur 40-50 th 51-60 th >60 th	Mutasi p16 ekson 2 <i>Contingency coefficient</i>	2 0,359	0,052

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,359,  $p=0,052$  antara umur dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM (lihat Tabel 5.12).



Grafik 5.9 Hubungan umur dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Hasil uji hubungan kelompok umur dan mutasi GST p16 ekson 2 menunjukkan pola kecenderungan menurun tajam yang tidak sesuai ( $p=0,052$ ) dengan peningkatan kejadian mutasi dan semakin bertambahnya umur, dapat dilihat pada Grafik 5.9

### 5.2.3 Hubungan antara perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

Uji hubungan antara perokok/penginang dengan deteksi mutasi GST p53 dan p16 menggunakan untuk *Contingency coefficient* untuk menilai hubungan penderita perokok/penginang yang dikelompokkan menjadi penderita perokok/penginang dan tidak merokok dengan mutasi p53; p53 ekson 5, p53 ekson 7 dan dengan mutasi p16: p16 ekson 1, p16 ekson 2.

#### 5.2.3.1 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM

Tabel 5.13 Hasil uji hubungan antara perokok/inginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Perokok / Penginang	Mutasi p53	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,375	0,010
Tidak Perokok / Penginang					

Terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,375 dan  $p=0,010$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 pada KSSRM, dapat dilihat pada Tabel 5.13

### 5.2.3.1.1 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Tabel 5.14 Hasil uji hubungan antara perokok /penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Perokok / Penginang	Mutasi p53 ekson 5	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,157	0,315
Tak Perokok / Penginang					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,157;  $p=0,315$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.14

### 5.2.3.1.2 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Tabel 5.15 Hasil uji hubungan antara perokok /penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Perokok /Penginang	Mutasi p53 ekson 7	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,367	0,013
Tak Perokok / Penginang					

Terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,367 dan  $p=0,013$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM, dapat dilihat pada Tabel 5.15



### 5.2.3.2 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM

Tabel 5.16 Hasil uji hubungan antara perokok /penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	p (sig)
Perokok / Penginang	Mutasi p16	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,244	0,112
Tak Perokok / Penginang					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai  $r = 0,244$  dan  $p=0,112$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi p16 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.16

#### 5.2.3.2.1 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM.

Tabel 5.17 Hasil uji hubungan antara perokok /penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	p (sig)
Perokok / Penginang	Mutasi p16 ekson 1	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,244	0,112
Tak Perokok / Penginang					

Tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $r = 0,244$  dan  $p=0,112$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi p16 ekson 1 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.17

**5.2.3.2.2 Hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM.**

Tabel 5.18 Hasil uji hubungan antara perokok /penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig.)
Perokok / Penginang	Mutasi p16 ekson 2	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,265	0,082
Tak Perokok / Penginang					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,265$  dan  $p = 0,082$  antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi p16 ekson 2 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.18

**5.2.4 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM**

Uji hubungan antara stadium klinis dengan deteksi mutasi GST p53 dan p16 menggunakan *Contingency coefficient* yang dikelompokkan menjadi stadium klinis I-II dan stadium klinis III-IV dengan mutasi p53, p53 ekson 5, p53 ekson 7 dan mutasi p16, p16 ekson 1 dan p16 ekson 2.

#### 5.2.4.1 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM

Tabel 5.19 Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p53	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,399	0,006
	III -IV					

Terdapat hubungan signifikan dengan nilai = 0,399 dan  $p=0,006$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.19

#### 5.2.4.1.1 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Tabel 5.20 Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p53 ekson 5	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,212	0,170
	III -IV					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,212 dan  $p=0,170$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.20

### 5.2.4.1.2 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Tabel 5.21 Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)	
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p53 ekson 7	Contingency coefficient	1	0,363	0,014
	III - IV					

Terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,363 dan  $p=0,014$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.21

### 5.2.4.2 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 pada KSSRM

Tabel 5.22 Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)	
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p16	Contingency coefficient	1	0,098	0,532
	III - IV					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,098 dan  $p=0,532$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p16 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.22

#### 5.2.4.2.1 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Tabel 5.23 Hasil uji Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df	Nilai	P (sig/)
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p16 ekson 1	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,098	0,532
	III - IV					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,098 dan  $p=0,532$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.23

#### 5.2.4.2.2 Hubungan antara stadium klinis dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Tabel 5.24 Hasil uji hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df	Nilai	P (sig/)
Stadium Klinis	I - II	Mutasi p16 ekson 2	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,015	0,926
	III - IV					

Tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai = 0,015;  $p=0,926$  antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM dapat dilihat pada Tabel 5.24



### 5.2.5 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM

Uji hubungan antara gambaran HPA penderita KSSRM dengan deteksi mutasi GST p53 dan p16 menggunakan *Contingency coefficient* yang dikelompokkan menjadi KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi p53 yang didapat dari mutasi p53 ekson 5 dan atau p53 ekson 7. Sementara mutasi p16 didapatkan dari mutasi p16 ekson 1 dan atau p16 ekson 2.

#### 5.2.5.1 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 pada KSSRM

Tabel 5.25 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek KSSRM dengan mutasi GST p53 pada KSSRM

Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
HPA KSSRM	Baik	Mutasi p53	Contingency coefficient	0,213	0,168
	Jelek				

Tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,213$  dan  $p = 0,168$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 dapat dilihat pada Tabel 5.25

### 5.2.5.1.1 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Tabel 5.26 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df		p (sig)
HPA KSSRM	Baik	Mutasi p53 ekson 5	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,365	0,013
	Jelek					

Terdapat hubungan yang signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,365$  dan  $p=0,013$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 5, dapat dilihat pada Tabel 5.26

### 5.2.5.1.2 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Tabel 5.27 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 7 pada KSSRM

Variabel			Jenis Uji	df	Nilai	P (sig)
HPA KSSRM	Baik	Mutasi p53 ekson 7	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,100	0,525
	Jelek					

Tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $\chi^2 = 0,100$  dan  $p=0,525$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 7, dapat dilihat pada Tabel 5.27

### 5.2.5.2 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi

#### GST p16 pada KSSRM

Tabel 5.28 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 pada KSSRM

Variabel		Mutasi p16	Jenis Uji	df	Nilai	P (.sig.)
HPA KSSRM	Baik					
	Jelek					

Terdapat hubungan signifikan dengan nilai = 0,300 dan  $p=0,047$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16, dapat dilihat pada Tabel 5.28

#### 5.2.5.2.1 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Tabel 5.29 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 1 pada KSSRM

Variabel		Mutasi p16 ekson 1	Jenis Uji	df	Nilai	P (.sig.)
HPA KSSRM	Baik					
	Jelek					

Terdapat hubungan signifikan dengan nilai = 0,300 dan  $p=0,047$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 1 dapat dilihat pada Tabel 5.29

### 5.2.5.2.2 Hubungan antara gambaran HPA dengan hasil deteksi mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

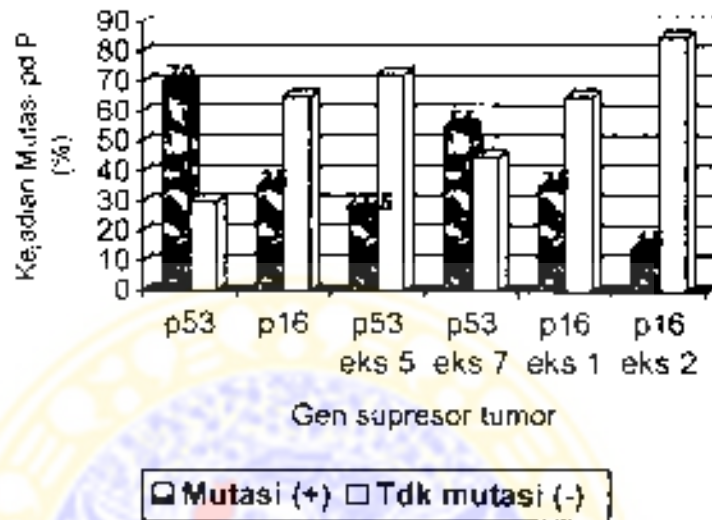
Tabel 5.30 Hasil uji hubungan antara gambaran HPA diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 2 pada KSSRM

	Variabel		Jenis Uji	df	Nilai	P (sig.)
HPA KSSRM	Baik	Mutasi p16 ekson 2	<i>Contingency coefficient</i>	1	0,139	0,376
	Jelek					

Tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai= 0,139 dan  $p=0,376$  antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 ekson 2 dapat dilihat pada Tabel 5.30



### 5.3 Rangkuman Hasil Penelitian Uji Beda antara Deteksi Mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM



Grafik 5.10 Hasil penelitian uji beda antara deteksi mutasi GST p53 dan p16 serta ekson- eksonnya pada KSSRM.

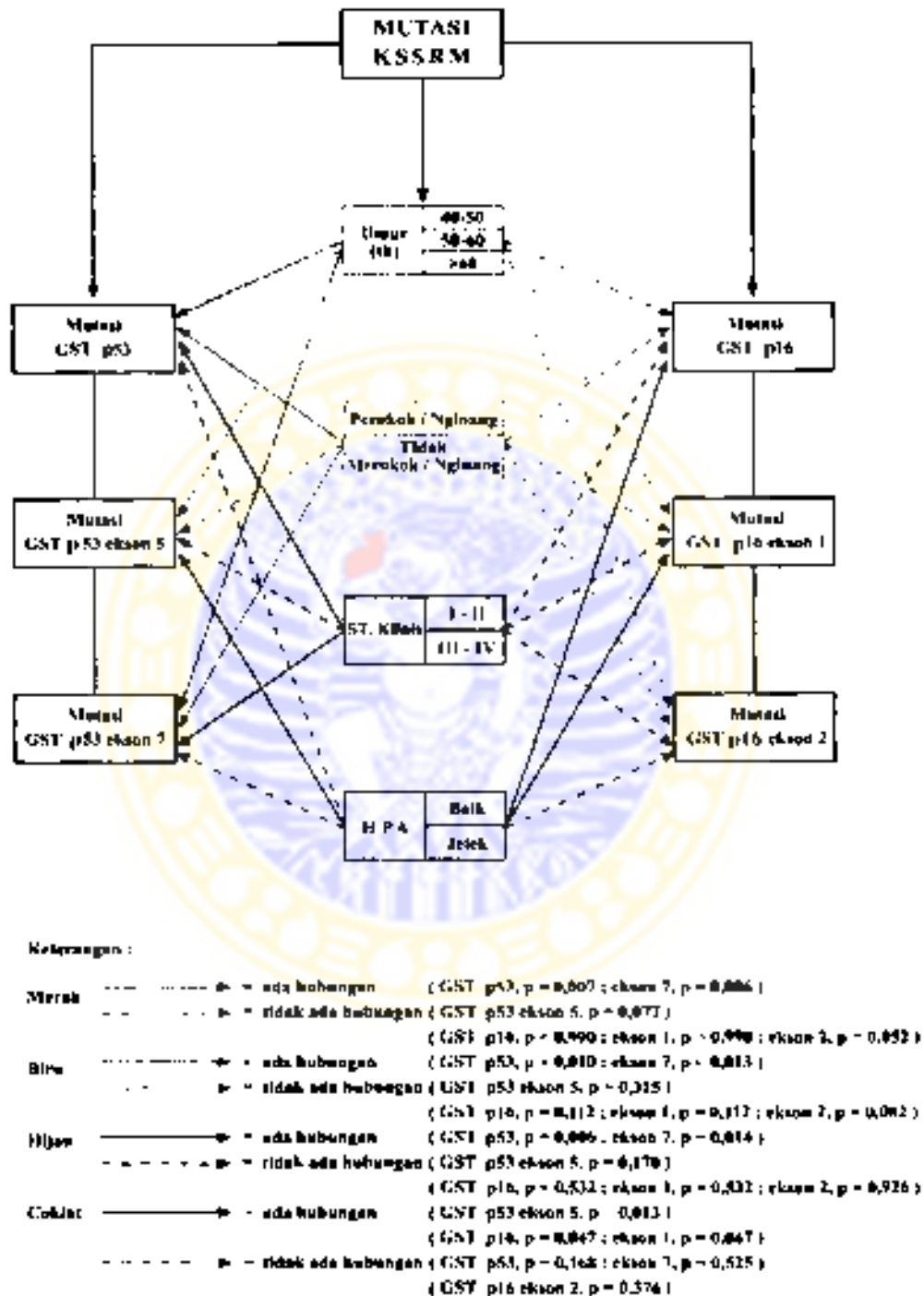
Pada Grafik 5.10 menunjukkan adanya perbedaan proporsi yang signifikan hasil deteksi mutasi GST p53 terjadi mutasi sebesar 70% lebih tinggi dibandingkan dengan GST p16 sebanyak 35% dengan nilai  $Z=9,825$  dan  $p=0,002$ . Hasil ini menunjukkan bahwa mutasi GST p53 yang ditemukan pada KSSRM tidak terpengaruh dengan perubahan aktivitas GST p16 dalam jalur siklus sel KSSRM sedangkan hasil deteksi mutasi pada GST p53 antara mutasi p53 ekson 5 (27,5%) dan p53 ekson 7 (55%) pada KSSRM terdapat perbedaan proporsi yang signifikan dengan mutasi p53 ekson 7 lebih tinggi dibandingkan dengan ekson 5 dengan nilai  $Z=6,241$  dan  $p=0,012$ . Hal ini menunjukkan bahwa mutasi p53 ekson 7 lebih sering terjadi dan paling sering terlibat dalam mekanisme patogenesis molekuler



KSSRM. Pada mutasi GST p16 sebesar 35%, terdapat perbedaan proporsi yang signifikan antara mutasi GST p16 ekson 1 (35%) lebih tinggi dari GST p16 ekson 2 (15%) pada KSSRM dengan nilai  $\chi^2 = 4,267$  dan  $p=0,039$ . Hasil ini menunjukkan GST p16 ekson 1 lebih sering terjadi mutasi dan terlibat serta berperan penting dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM.

Hasil penelitian ini dapat dirangkum sebagai berikut: mutasi yang terjadi pada KSSRM didapatkan mutasi GST p53 paling tinggi (70%) dengan mutasi p53 ekson 7 (55%) dan mutasi p53 ekson 5 (27,5%), mutasi pada GST p16 sebesar 35% ditemukan mutasi p16 exon 1 (35%) dan paling rendah ekson 2 (15%), mutasi yang didapatkan pada GST p53 adalah mutasi heterozigot 27/29 (93,2%) dan homozigot 2/29 (6,8%); GST p53 ekson 5 didapatkan mutasi homozigot 2/11 (18,2%), heterozigot 9/11 (81,8%) dan GST p53 ekson 7 didapatkan mutasi heterozigot paling banyak 22/22 (100%) dan mutasi homozigot 0 (0%). Sementara mutasi pada GST p16 didapatkan mutasi homozigot 13/20 (65%), heterozigot 7/20 (35%) dan GST p16 ekson 1 didapatkan mutasi sebesar 14/40 (35%) dengan mutasi homozigot paling tinggi 10/14 (71,4%), heterozigot 4/14 (28,6%) dan GST p16 ekson 2 didapatkan mutasi sebesar 6/40 (15%) dengan mutasi homozigot 4/6 (66,7%) dan heterozigot 2/6 (33,3%). Hasil penelitian ini telah menunjukkan adanya pola mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM.

#### 5.4 Ringkasan Hasil Penelitian Uji Hubungan antara Gambaran Klinis Dan HPA dengan Deteksi Mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM.



Gambar 5.10 Hasil penelitian uji hubungan antara status klinis; umur, perokok/penginang, stadium klinis dan data HPA; diferensiasi baik dan jelek dengan hasil deteksi mutasi GST p53 dan p16 serta ekson- eksonnya pada KSSRM.

Pada Gambar 5.10 terdapat hubungan signifikan antara umur dengan mutasi GST p53 dengan nilai  $r = 0,448$  dan  $p = 0,007$  seperti pada GST p53 ekson 7 terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $r = 0,454$ ;  $p = 0,006$  namun pada GST p53 ekson 5 tidak ada hubungan umur dengan kejadian mutasi GST p53 pada KSSRM dengan nilai  $r = 0,337$ ;  $p = 0,077$ . Sementara uji hubungan umur dengan mutasi GST p16 pada KSSRM tidak didapatkan hubungan yang signifikan dengan nilai  $r = 0,022$ ;  $p = 0,990$  baik pada GST p16 ekson 1 dengan nilai  $r = 0,022$ ;  $p = 0,990$  maupun pada GST p16 ekson 2 dengan nilai  $r = 0,359$ ;  $p = 0,052$ .

Terdapat hubungan yang signifikan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 pada KSSRM dengan nilai  $r = 0,375$ ;  $p = 0,010$  seperti pada mutasi GST p53 ekson 7 dengan nilai  $r = 0,367$  dan  $p = 0,013$ . Namun tidak terdapat hubungan yang signifikan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM dengan nilai  $r = 0,157$  dan  $p = 0,315$  sedangkan hubungan antara perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 pada KSSRM tidak terdapat hubungan signifikan dengan nilai  $r = 0,244$ ;  $p = 0,112$  baik pada ekson 1 dengan nilai  $r = 0,244$ ;  $p = 0,112$  maupun ekson 2 dengan nilai  $r = 0,265$  dan  $p = 0,082$ .

Terdapat hubungan yang signifikan antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 pada KSSRM dengan nilai  $r = 0,339$  dan  $p = 0,006$  seperti pada mutasi GST p53 ekson 7 dengan nilai  $r = 0,363$  dan  $p = 0,014$  namun tidak terdapat hubungan yang signifikan antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 ekson 5 dengan nilai  $r = 0,212$  dan  $p = 0,170$  sedangkan uji hubungan stadium klinis dengan mutasi GST p16 pada KSSRM tidak terdapat hubungan yang signifikan antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST

p16 dengan nilai = 0,098 dan  $p = 0,532$  baik pada ekson 1 dengan nilai = 0,098 dan  $p = 0,532$  maupun pada ekson 2 dengan nilai = 0,015 dan  $p = 0,926$

Tidak terdapat hubungan yang signifikan antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 dengan nilai = 0,213 dan  $p = 0,168$  seperti pada GST p53 ekson 7 dengan nilai = 0,100 dan  $p = 0,525$  namun terdapat hubungan yang signifikan antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 ekson 5 dengan nilai = 0,365 dan  $p = 0,013$ . Pada penelitian ini terdapat hubungan yang signifikan antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 dengan nilai = 0,300 dan  $p = 0,047$  seperti pada mutasi GST p16 ekson 1 dengan nilai = 0,300 dan  $p = 0,047$  namun tidak terdapat hubungan yang signifikan antara HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek pada mutasi GST p16 ekson 2 dengan nilai = 0,139 dan  $p = 0,376$ .

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengungkap patogenesis molekuler KSSRM melalui pola mutasi GST p53 dan p16 serta yang hubungannya dengan gambaran klinis dan histopatologis. Pola mutasi GST p53 dan GST p16 diperoleh melalui hasil PCR GST p53 dan p16 dan hasil deteksi mutasi PCR-SSCP GST p53 dan GST p16. Hasil deteksi mutasi GST p53 dan GST p16 tersebut pada berbagai penelitian banyak dihubungkan dengan parameter gambaran klinis berupa umur, perokok/penginang, stadium klinis dan histopatologisnya berupa KSSRM diferensiasi baik dan jelek sesuai dengan yang dilakukan peneliti Chen *et al.*, (1999), Sartor, (1999), Hsieh *et al.*, (2001), Yamazaki *et al.*, (2003), Chaves *et al.*, (2004). Namun perbedaannya, penelitian yang dilakukan para peneliti diluar negeri tersebut tidak melakukan penelitian secara khusus mengenai pola mutasi p53 (ekson 5, 7) dan p16 (ekson 1, 2) pada KSSRM yang dihubungkan dengan umur, perokok atauinginang, KSSRM diferensiasi baik dan jelek.

#### 6.1 Optimasi PCR GST p53 dan GST p16 pada KSSRM

Hasil optimasi PCR GST p53 dan GST p16 pada 40 sampel KSSRM dan 16 sampel kontrol diperoleh kondisi PCR produk GST p53 dan GST p16 yang diharapkan yaitu didapatkan 1 pita DNA dengan intensitas yang kuat sehingga untuk amplifikasi PCR GST p53 ekson 5 dan ekson 7 serta kontrolnya diperoleh produk PCR dengan ukuran 300 bp. Hasil ini sesuai dengan PCR produk p53 yang diharapkan. Hasil optimasi PCR GST p16 pada 40 sampel KSSRM dan 16 sampel kontrol didapatkan 1 pita DNA dengan ukuran 125 bp pada GST p16 ekson 1 serta



kontrolnya, sedangkan GST p16 ekson 2 serta kontrolnya didapatkan 1 pita DNA dengan ukuran 307 bp sesuai dengan produk PCR yang diharapkan.

## 6.2 Deteksi Mutasi PCR-SSCP GST p53 dan GST p16 pada KSSRM

Frekuensi kejadian mutasi GST p53 pada berbagai kanker di seluruh tubuh merupakan mutasi terbanyak ditemukan rata-rata lebih dari 50% yang terletak pada daerah ekson 5 - 8 terutama ekson 5 dan 7 pada karsinoma kolorektal dan laring (Leahy *et al.*, 1996, Zang *et al.*, 2000). Sementara frekuensi GST p16 merupakan GST terbanyak kedua setelah p53 pada berbagai kanker di seluruh tubuh antara 30-50% yang terletak pada daerah *hot spot region* ekson 1-3 (Sherr, 1996; Liggett *and* Sidransky, 1998). Pada penelitian ini kejadian mutasi pada GST p53 pada KSSRM menunjukkan frekuensi paling tinggi 28/40 (70%), ekson 7; 22/40 (55%) dan ekson 5; 11/40 (27,5%), sedangkan GST p16 didapatkan mutasi 14/40 (35%), ekson 1; 14/40 (35%) dan paling rendah ekson 2; 6/40 (15%). Hasil penelitian ini menunjukkan adanya konsistensi frekuensi mutasi rata-rata GST p53 lebih tinggi dari 50% dan GST p16 rata-rata 30-50% seperti di luar negeri (Sherr, 1996; Liggett *and* Sidransky, 1998). Pada penelitian ini terdapat perbedaan signifikan antara kejadian mutasi GST p53 sebesar 70% dengan mutasi homozigot 6,8% dan GST p16 sebanyak 35% ( $p=0,002$ ) dengan mutasi homozigot 65%, hasil ini menunjukkan bahwa mutasi GST p53 lebih sering terlibat dalam pengendalian molekuler pada siklus sel KSSRM dan tidak terpengaruh oleh perubahan inaktivitas GST p16 dalam jalur siklus sel KSSRM. Mutasi p53 yang terjadi sebesar 70% menunjukkan fungsi p53 sebagai pengendali gen pada siklus sel mengalami inaktivasi sebanyak 70% atau hilangnya stabilitas fungsi p53 sebagai faktor

transkripsi gen p21 Waf1/Cip1, MDM2, GADD45, 14-3-3 $\alpha$  Bax dan KILLER/DR5 yang berperan penting pada pengendalian dan pengaturan siklus sel, perbaikan DNA yang rusak serta apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa p53 lebih berperan langsung pada fase G1/S dibandingkan dengan gen p21 yang juga mempunyai aktivitas secara langsung pada fase G1/S, namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Pada penelitian ini GST p16 frekuensi mutasinya (35%) lebih sedikit dibandingkan dengan mutasi GST p53 (70%) namun ditemukan mutasi homozigot sebesar 65 %, hal ini menunjukkan bahwa p16 juga berperan penting dalam pengendalian laju siklus sel kanker tak terkendali sebagai penyebab KSSRM. Pada penelitian ini tidak didapatkan mutasi p53 sebesar 30% dan p16 sebesar 65%, hal ini kemungkinan disebabkan ada mekanisme gen- gen lainnya seperti gen p21, pRb, p27 terlibat langsung dalam mekanisme pengendalian siklus sel kanker terutama pada fase G1-S siklus sel. Pada penelitian ini juga ditemukan mutasi p53 ekson 7 (55%) dengan mutasi heterozigot (100%) lebih tinggi dari mutasi p53 ekson 5 (27,5%) dengan mutasi homozigot sebesar 18,2 % dengan perbedaan yang signifikan ( $p= 0,012$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada KSSRM lebih sering terjadi mutasi p53 pada ekson 7 dari pada ekson 5 dan paling sering terlibat dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM. Sementara gen p53 ekson 5 dengan mutasi heterozigot 81,8% dan mutasi homozigot 18,2 % sudah dapat menimbulkan proliferasi sel tak terkendali sehingga p53 ekson 5 juga berperan penting dalam pengendalian siklus sel kanker. Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan ( $p= 0,039$ ) antara GST p16 ekson 1 (35%) dengan mutasi homozigot 71,4% dan ekson 2 (15 %) dengan mutasi homozigot 66,7% Hal ini menunjukkan bahwa p16 ekson 1 lebih sering terlibat dan berperan penting dalam mekanisme

patogenesis molekuler KSSRM terutama dalam pengendalian molekuler pada fase G1-S siklus sel dibandingkan dengan p16 ekson 2. Pada penelitian ini GST p16 hanya ditemukan mutasi sebesar 35% dan paling rendah pada ekson 2 sebesar 15%. Hasil frekuensi mutasi GST p16 yang relatif sedikit ini diduga ada mekanisme gen-gen lainnya yang terlibat dalam perubahan inaktivitas GST p16 terutama gen-gen yang terlibat dalam jalur Rb yaitu siklin D1, CDK4, CDK6, siklin E, siklin, CDKI, pRb dan E2F yang berperan pula dalam pengaturan molekuler terutama pada fase G1 siklus sel. Hasil penelitian pada GST p53 menunjukkan adanya mutasi heterozigot 27/29 (93,2%) dan mutasi homozigot 2/29 (6,8%) sedangkan pada GST p16 terjadi mutasi homozigot 13/20 (65%) dan mutasi heterozigot 7/20 (35 %). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian di luar negeri yang melaporkan bahwa mutasi heterozigot lebih banyak terjadi pada GST p53 dan mutasi homozigot lebih sering terjadi pada GST p16 (Papp *et al.*, 1997), hanya terdapat perbedaan frekuensi mutasi heterozigot dan homozigot pada berbagai kanker dan lokasi geografis. Pada penelitian ini, didapatkan GST p53 dengan mutasi heterozigot paling tinggi pada ekson 7 yaitu 22/22 (100%), mutasi homozigot 0/22 (0%) dan ekson 5; mutasi heterozigot 9/11 (81,8%), mutasi homozigot 2/11 (18,2%). Hasil penelitian ini tidak setara dengan berbagai penelitian di luar negeri yang menunjukkan pada GST p53 terjadi mutasi heterozigot 65 % di Cina (Chen *et al.*, 1995); mutasi heterozigot p53 (ekson 2-9) 55 % di Inggris (Trivedy *et al.*, 1998) dan jarangya frekuensi mutasi heterozigot GST p53 di India (Kannan *et al.*, 2000). Hal ini menunjukkan bahwa mutasi p53 terutama pada ekson 7 sebesar 55 % dengan mutasi heterozigot sebanyak 100% menyebabkan inaktivasi p53 yaitu terjadi mutasi dominan pada salah satu dari kedua alel yang menyebabkan proliferasi siklus sel makin tak terkendali sebagai

penyebab keganasan terutama pada KSSRM sehingga p53 ekson 7 ideal sebagai indikator molekuler untuk memantau tingkat keganasan kanker terutama KSSRM. Sementara p53 ekson 5 walaupun ditemukan lebih sedikit (27,5 %) kemungkinan mekanisme gen-gen lain ikut terlibat dalam pengendalian siklus sel KSSRM sehingga mutasi dapat terjadi diluar lokasi ekson 5 atau dapat terjadi pada *hot spot region* lainnya. Menariknya pada p53 ekson 5 ditemukan mutasi heterozigot yang tinggi sebanyak 81,8%, hal ini menunjukkan p53 ekson 5 juga mempunyai peranan penting dalam pengendalian siklus sel kanker sebagai penyebab KSSRM dan dapat pula dijadikan target molekuler indikator untuk memantau tingkat keganasan KSSRM. Pada penelitian ini didapatkan mutasi homozigot GST p16 paling tinggi pada ekson 1 sebesar 10/14 (71,4%) dan ekson 2 sebanyak 4/6 (66,7%). Hasil penelitian ini tidak setara dengan berbagai penelitian di luar negeri yang menunjukkan bahwa GST p16 (ekson 1-3) pada KSSRM didapatkan mutasi homozigot sebesar 78% (Shahnavaz *et al.*, 2001). Disamping itu GST p16 ekson 1 dengan mutasi homozigot sebesar 71,4 % dapat mengakibatkan hilangnya kedua alel *wild type* gen p16 sehingga menyebabkan proliferasi tak terkendali sebagai penyebab KSSRM. Mengingat p16 ekson 1 dengan mutasi homozigot sebesar 71,4 % sering terlibat dan berperan penting dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM sehingga dapat dijadikan molekuler indikator untuk diagnosis dan prognosis KSSRM. Perbedaan variasi mutasi pada penelitian ini dengan berbagai penelitian di luar negeri disebabkan adanya perbedaan populasi, lokasi geografis, ras dan faktor etiologi regional KSSRM yang berbeda.



### **6.3 Hubungan Gambaran Klinis; Umur, Perokok/Penghisap, Stadium Klinis dan HPA Diferensiasi Baik dan Jelek dengan Mutasi GST p53 dan p16 pada KSSRM**

#### **6.3.1 Hubungan umur dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM**

Hasil deteksi uji hubungan gambaran klinis dengan mutasi GST p53 di beberapa negara bervariasi seperti hubungan umur dengan mutasi GST p53 menunjukkan bahwa tidak terdapat adanya hubungan yang signifikan (Lam *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2001; Yamazaki *et al.*, 2003). Pada penelitian ini, hasil uji hubungan umur dengan mutasi GST p53 tidak setara dengan temuan di luar negeri karena terdapat hubungan yang signifikan antara umur yang dikelompokkan terdiri dari umur 40-50 th, 51-60 th dan lebih 60 tahun dengan mutasi GST p53 pada KSSRM ( $p = 0,007$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan pola kecenderungan semakin tinggi usia yaitu umur lebih dari 60 th didapatkan frekuensi mutasi yang tinggi pula yaitu 90% dibandingkan dengan kelompok umur 40-50 th dengan mutasi sebesar 36,4% sesuai dengan konsep teori evolusi klonal sehingga dengan bertambahnya usia kemungkinan mendapat mutasi berulang-ulang menjadi semakin besar. Hasil uji asosiasi umur dengan pada GST p53 ekson 7 menunjukkan hasil yang signifikan ( $p = 0,006$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada p53 ekson 7 lebih sering terjadi pada usia tua namun pada GST p53 ekson 5 tidak menunjukkan hasil yang signifikan ( $p = 0,077$ ) dan tidak setara dengan beberapa peneliti yang melaporkan mutasi p53 ekson 5-9 pada kanker esofagus ditemukan sebesar 33,3 % terbanyak mutasi pada ekson 7 dan 8 di Hongkong Sementara mutasi p53 ekson 5-9 sebanyak 48,66% ditemukan terbanyak mutasi pada ekson 5 tidak mempunyai hubungan dengan umur di Cina (Lam *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2001).



Hasil penelitian ini walaupun tidak sesuai dengan teori evolusi klonal namun menunjukkan bahwa mutasi p53 ekson 5 dapat terjadi pada usia muda dan tua. Hasil deteksi uji hubungan umur dengan mutasi GST p16 pada ekson 1 dan ekson 2 masih belum dilakukan baik di dalam maupun di luar negeri. Pada penelitian ini uji hubungan umur dengan mutasi GST 16 tidak terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,892$ ) antara umur dengan mutasi GST p16 baik pada ekson 1 ( $p=0,892$ ) dan ekson 2 ( $p=0,052$ ). Hal ini menunjukkan mutasi p16 baik pada ekson 1 dan ekson 2 dapat terjadi pada usia muda dan usia tua.

### **6.3.2 Hubungan perokok/penginang dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM**

Hasil uji hubungan antara penderita perokok/penginang dengan mutasi p53 di beberapa negara seperti di negara Eropa, Amerika, Australia, Cina dan Jepang dilaporkan kejadian mutasi gen p53 KSSRM rata-rata sebesar 163/383 (42%) yang mempunyai hubungan signifikan dengan penggunaan tembakau atau perokok namun sinergi dengan peminum alkohol. Sementara kejadian mutasi gen p53 KSSRM didapatkan rata-rata sebesar 19,89% di India, Sri Lanka, Papua Neugini dan Asia Tenggara yang mempunyai hubungan yang signifikan pada penderita KSSRM pengunyah tembakau (penginang). Dilaporkan pula mutasi gen p53 sebesar 91/187 (48,66%) tidak terdapat hubungan yang signifikan dengan umur, jenis kelamin, stadium tumor, perokok atau pemakan sirih/penginang di Taiwan (Hsieh *et al.*, 2001). Pada penelitian ini terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,010$ ) antara penderita perokok/penginang (82,1%) dan tidak perokok/penginang (41,7%) dengan mutasi GST p53 sebesar 70% pada KSSRM. Demikian pula terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,013$ ) antara mutasi yang terjadi pada

penderita perokok/penginang (67,9%) dan tidak perokok/penginang (25%) dengan kejadian mutasi pada p53 ekson 7 pada KSSRM Hasil ini tidak setara dengan dengan peneliti di luar negeri seperti di Eropa, Amerika, Australia, Cina, Taiwan, Jepang, India, Srilanka, Papua Neugini dan Asia Tenggara. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh paparan bahan karsinogen yang berbeda pada penderita perokok/penginang maupun tidak perokok/penginang pada ras, lokasi geografis sehingga menyebabkan adanya heterogenitas perubahan genetik spesifik termasuk pola mutasi pada KSSRM. Pada penelitian ini didapatkan pula hubungan yang tidak signifikan antara perokok/penginang (27,5%) dan tidak perokok/penginang (72,5%) dengan mutasi GST p53 ekson 5 pada KSSRM ( $p= 0,315$ ) Hasil ini menunjukkan bahwa pengaruh rokok/penginang sebagai bahan karsinogenik tidak cukup untuk dapat menimbulkan adanya mutasi yang spesifik kemungkinan ada faktor eksogen lainnya seperti virus HPV dan HBV yang dapat mempengaruhi aktivitas GST p53 pada ekson 5 sehingga p53 ekson 5 bukan spesifik target diagnostik untuk penderita perokok/penginang pada KSSRM. Disamping itu adanya perbedaan hasil uji hubungan penderita perokok/penginang dan mutasi pada GST p53 baik ekson 5 dan ekson 7 dengan penelitian di luar negeri ini disebabkan adanya perbedaan populasi yang diteliti, lokasi geografis dan paparan bahan karsinogen yang berbeda.

Hasil uji hubungan penderita perokok/penginang dan tidak perokok/penginang dengan mutasi GST p16 di Taiwan (27%) dan di India (9%) tidak didapatkan hubungan yang signifikan (Kannan *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000). Pada penelitian ini, hubungan antara mutasi yang terjadi penderita KSSRM perokok/penginang (42,9%) dan bukan perokok/penginang (16,7%) dengan mutasi GST p16 (35%) tidak didapatkan hubungan yang signifikan ( $p= 0,112$ ) baik pada

ekson 1 sebesar 16,7% ( $p=0,112$ ) maupun pada ekson 2 sebanyak 21,4% ( $p=0,082$ ). Penelitian ini tidak setara dengan penelitian di Taiwan dan di India yang menunjukkan bahwa adanya perbedaan frekuensi dan daerah *hot spot* mutasi GST p16 yang diteliti tidak sama. Hasil penelitian ini berbeda dengan peneliti di luar negeri disebabkan adanya perbedaan populasi, ras, lokasi geografis dan paparan bahan karsinogen yang berbeda dan faktor rokok/tinggung pada populasi ini tidak banyak berpengaruh terhadap perubahan genetik termasuk sebagai penyebab mutasi p16 pada KSSRM.

### 6.3.3 Hubungan stadium klinis dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM

Hasil uji hubungan stadium klinis pada kanker esofagus di Cina tidak didapatkan hubungan yang signifikan dengan mutasi GST p53 pada ekson 5 sebesar 78%. Sementara di Kanada terdapat adanya hubungan yang signifikan antara stadium klinis yaitu stadium lanjut dengan mutasi GST p53 KSSRM sebesar 53%, sedangkan di Jepang didapatkan hubungan yang signifikan pula antara stadium klinis dengan mutasi GST p53 pada KSSRM sebesar 51/121 (42%). Pada penelitian ini didapatkan hubungan yang sangat signifikan ( $p=0,006$ ) antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p53 (70%), seperti hasil yang didapatkan pada mutasi p53 ekson 7: 55% ( $p=0,014$ ). Penelitian ini tidak setara dengan penelitian di Kanada dan Jepang. Disamping itu hasil penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi GST p53 paling banyak ditemukan pada stadium lanjut (III-IV) sebanyak 84,6% seperti ekson 7 pada stadium lanjut (III-IV) sebesar 69,2% yang berhubungan dengan transformasi fenotip keganasan dan progresivitas tumor. Pada penelitian ini tidak

terdapat hubungan yang signifikan antara stadium klinis I-II dan dan III-IV dengan mutasi pada p53 ekson 5 sebanyak 27% ( $p=0,170$ ). Hal ini menunjukkan bahwa p53 ekson 5 merupakan *hot spot region* yang tidak berhubungan langsung dalam transformasi keganasan KSSRM kemungkinan terdapat mekanisme gen-gen lainnya yang ikut berperan dalam pengendalian laju proliferasi siklus sel tak terkendali sehingga yang sering terkena mutasi bisa terjadi diluar lokasi ekson 5 pada *hot spot region* p53.

Hasil uji hubungan stadium klinis kanker laring di Spanyol terdapat hubungan antara stadium klinis (III-IV – stadium lanjut) dengan mutasi GST p16 sebesar 22% (Jares *et al.*, 1997). Sementara di Cina dilaporkan terdapat hubungan yang signifikan ( $p<0,05$ ) antara stadium klinis I + II dan stadium klinis III + IV dengan mutasi GST 16 sebesar 27% (Liu *et al.*, 2003), namun di Taiwan tidak ditemukan hubungan antara stadium klinis dengan mutasi GST p16 KSSRM sebanyak 54% (Tsay *et al.*, 2001). Pada penelitian ini tidak terdapat hubungan yang signifikan ( $p= 0,532$ ) antara stadium klinis I-II dan III-IV dengan mutasi GST p16 sebesar 35% baik sepanjang ekson 1 sebanyak 35% ( $p=0,532$ ) dan ekson 2 sebesar 15% ( $p=0,926$ ). Hasil penelitian ini tidak setara dengan peneliti di Taiwan (Jares *et al.*, 1997) yang menunjukkan bahwa perubahan inaktivasi GST p16 baik ekson 1 dan 2 tidak berperan langsung dalam perkembangan keganasan KSSRM kemungkinan ada mekanisme aktivitas gen lainnya seperti gen p21, pRb, p27 dan onkogen lainnya seperti siklusin D1, CDK2, CDK4, E2F yang sering terlibat dalam mekanisme inaktivasi GST p16 pada KSSRM.



### 6.3.4 Hubungan HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 dan GST p16 pada KSSRM

Pada penelitian ini tidak didapatkan hubungan yang signifikan ( $p=0,168$ ) antara KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p53 sebesar 70%, sama seperti pada mutasi ekson 7 sebanyak 55% ( $p=0,525$ ). Hal ini menunjukkan bahwa GST p53 dan p53 ekson 7 tidak berperan langsung dalam hubungannya dengan derajat diferensiasi sel KSSRM kemungkinan ada mekanisme gen-gen lainnya yang secara langsung berperan dalam mekanisme patogenesis molekuler seperti gen p21 yang secara langsung dapat menghambat aktivitas proliferasi sel yang berlebihan pada siklus sel. Sementara mutasi yang terjadi pada GST p53 ekson 5 (27,5%) dengan mutasi heterozigot 81,8 % dan mutasi homozigot 18,2 % terdapat hubungan yang signifikan ( $p= 0,013$ ) dengan KSSRM diferensiasi baik dan jelek. Hasil ini juga tidak setara dengan penelitian di Jerman pada kanker kepala leher dan di Cina pada kanker payudara (Bockmull *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1995) sehingga hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada GST p53 ekson 5 walaupun frekuensi kejadian mutasi relatif sedikit namun memegang peranan penting dalam progresivitas kanker, hal ini ditunjukkan dengan adanya mutasi p53 ekson 5 pada KSSRM diferensiasi baik sebesar 20% dan terjadi peningkatan mutasi sebesar 80% pada KSSRM diferensiasi jelek, sehingga p53 ekson 5 ideal untuk dijadikan indikator untuk memantau tingkat keganasan kanker terutama pada keadaan ditemukannya KSSRM dengan diferensiasi baik sehingga dapat digunakan sebagai indikator diagnosis maupun prognosis molekuler KSSRM.

Hasil uji hubungan gambaran HPA KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 di Taiwan menunjukkan adanya hubungan signifikan



dengan mutasi GST p16 KSSRM sebesar 14,6% (Tsai *et al.*, 2001), namun di Cina tidak terdapat hubungan yang signifikan antara KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 sebanyak 27% (Liu *et al.*, 2003). Pada penelitian ini terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,047$ ) antara KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 sebesar 35%, seperti pada ekson 1 sebanyak 35% ( $p=0,047$ ) dengan mutasi homozigot paling tinggi 71,4 %. Hasil ini menunjukkan bahwa perubahan inaktivitas GST p16 merupakan perubahan genetik yang terjadi pada KSSRM diferensiasi baik dapat mengakibatkan gradasi sel kanker menjadi lebih buruk sehingga GST p16 terutama ekson 1 memegang peranan penting dalam progresivitas tumor pada KSSRM diferensiasi baik. Dengan demikian p16 ekson 1 dapat dijadikan molekul indikator untuk diagnosis dan prognosis KSSRM namun sebaliknya pada GST p16 ekson 2 tidak terdapat hubungan yang signifikan ( $p=0,376$ ) antara KSSRM diferensiasi baik dan jelek dengan mutasi GST p16 sebesar 15%, sehingga hasil penelitian pada GST p16 ekson 2 tidak menunjukkan adanya hubungan dengan progresivitas kanker dan kemungkinan tidak memegang peranan penting dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM karena ada mekanisme gen-gen lainnya seperti gen p21, pRb, p27 yang terlibat langsung dalam mekanisme patogenesis molekuler KSSRM terutama pada pengendalian molekuler pada fase G1/S siklus sel KSSRM.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini terdapat perbedaan frekuensi kejadian mutasi GST p53 dan p16 yang signifikan ( $p=0,002$ ). Mutasi p53 ditemukan paling banyak sebesar 70% terletak pada daerah ekson 7 (55%) dengan mutasi heterozigot 100 % dan ekson 5 (27,5%) dengan mutasi heterozigot 81,8% dibandingkan dengan kejadian mutasi GST p16 KSSRM sebesar 35% pada ekson 1 (35%) dan ekson 2 (15%) dengan mutasi homozigot paling tinggi pada ekson 1 (71,4%),  $p= 0,002$ . Hal ini menunjukkan bahwa GST p53 terutama ekson 7 dan 5 dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM sedangkan GST p16 terutama ekson 1 dapat pula dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM.
2. Terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p53 (70%) dengan semakin bertambahnya umur lebih 60 th; 90% ( $p= 0,007$ ) seperti pada ekson 7 (55%) dengan  $p=0,006$ . Hal ini menunjukkan bahwa mutasi pada GST p53 terutama ekson 7 lebih sering terjadi pada usia tua.
3. Tidak terdapat perbedaan kejadian mutasi GST 16 (35%) dengan semakin bertambahnya umur lebih 60 th; 33,3% ( $p= 0,990$ ). Hal tersebut menunjukkan bahwa mutasi GST p16 dapat terjadi pada usia muda maupun usia tua
4. Terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p53 (70%) pada penderita perokok/penginang (82,1%) dibandingkan dengan tidak perokok/penginang (41,7%);  $p= 0,010$  seperti pada ekson 7 (50%) dengan  $p 0,013$ . Hal ini

- menunjukkan pengaruh rokok/tingang dapat merupakan faktor pemicu perubahan genetik atau mutasi gen p53 terutama pada ekson 7 penderita KSSRM dan p53 ekson 7 merupakan lokasi *hot spot* mutasi p53 yang sering terkena paparan bahan karsinogenik.
5. Tidak terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p16 (35%) pada penderita perokok/penginang (42,9%) dengan bukan perokok/penginang (25%),  $p=0,112$ . Hal tersebut menunjukkan pengaruh rokok/tingang bukan faktor resiko pemicu perubahan genetik spesifik termasuk mutasi GST p16 pada KSSRM.
  6. Terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p53 (70%) pada penderita stadium klinis I-II (42,9%) dan III-IV (84,6%),  $p=0,006$  menunjukkan mutasi GST p53 paling banyak ditemukan pada stadium lanjut seperti ekson 7 dengan stadium klinis I-II (28,6%), III-IV (69,2%),  $p=0,014$ , yang berhubungan dengan transformasi fenotip keganasan pada penderita KSSRM. Dengan demikian GST p53 terutama ekson 7 merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan yang kuat dengan stadium klinis KSSRM dan dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler KSSRM untuk memantau tingkat keganasan KSSRM.
  7. Tidak terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p16 (35%) pada penderita stadium klinis I-II (28,6%) dengan III-IV (38,5%);  $p=0,532$ . Hal ini menunjukkan GST p16 tidak berperan langsung dalam perkembangan progresivitas keganasan pada KSSRM.
  8. Tidak terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p53 (70%) pada penderita dengan KSSRM diferensiasi sel baik (60%) dan jelek (80%),  $p=0,168$  kecuali GST p53 ekson 5 (27,5%) yang mempunyai hubungan signifikan ( $p=0,013$ ) dan berperan

penting dalam progresivitas kanker. Dengan demikian p53 ekson 5 dapat merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan kuat dengan gambaran HPA KSSRM sehingga dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM.

9. Terdapat perbedaan kejadian mutasi GST p16 (35%) pada penderita KSSRM dengan diferensiasi sel baik (20%) dan jelek (50%),  $p= 0,047$ . Hal tersebut menunjukkan GST p16 terutama pada ekson 1 (35%) berperan penting dalam progresivitas KSSRM sehingga dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM.

#### Hasil Temuan Baru

1. Deteksi mutasi GST p53 KSSRM didapatkan kejadian mutasi yang paling tinggi 70% dan p53 ekson 7 sebesar 55% dengan mutasi heterozigot 100%, yang menunjukkan adanya hubungan secara signifikan ( $p<0,05$ ) dengan parameter gambaran klinis: umur, penderita perokok/penginang, stadium klinis. Dengan demikian GST p53 ekson 7 dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM dan merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan kuat dengan gambaran klinis KSSRM. Sementara mutasi p53 ekson 5 sebesar 27,5 % dengan mutasi homozigot 18,2 % menunjukkan hubungan signifikan ( $p= 0,013$ ) dengan KSSRM diferensiasi baik dan jelek sehingga GST p53 ekson 5 dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada KSSRM dan merupakan daerah *hot spot* mutasi p53 yang mempunyai hubungan kuat dengan gambaran HPA KSSRM. Hasil temuan ini merupakan



data baru mutasi gen pada *hot spot region* gen p53 yang penting untuk menentukan perbedaan karakteristik pertumbuhan kanker dan perubahan inaktivasi atau mutasi gen pada daerah *hot spot* mutasi gen p53 kanker lainnya sehingga dapat lebih meningkatkan pemahaman dasar patogenesis molekuler kanker terutama pada KSSRM.

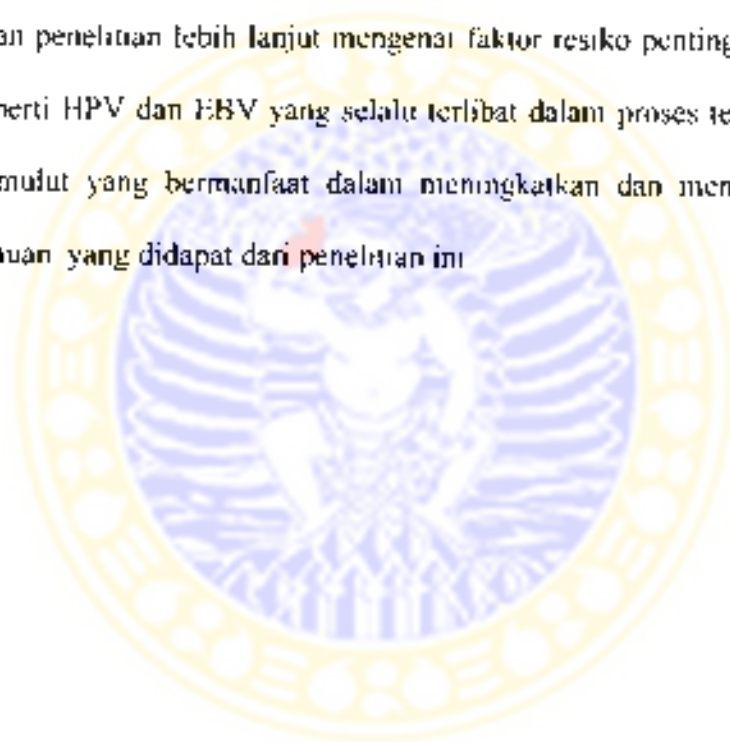
2. GST p16 ekson 1 (35%) dengan mutasi homozigot paling tinggi (71,4%) menunjukkan adanya hubungan secara signifikan ( $p = 0,047$ ) dengan penderita KSSRM diferensiasi baik dan jelek serta berperan penting dalam progresivitas tumor sehingga p16 ekson 1 dapat dijadikan target indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik pada penderita KSSRM. Hasil Temuan ini diharapkan dapat menunjang diagnosis klinis dan HPA sehingga penanganan penderita akan menjadi lebih baik berdasarkan pada penentuan diagnosis, prognosis yang lebih tepat dan akurat

## 7.2 Saran

1. GST p53 ekson 7 dapat dijadikan indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik untuk KSSRM yang mempunyai hubungan kuat dengan gambaran klinis KSSRM dan GST p53 ekson 5 dapat dijadikan indikator diagnosis dan prognosis molekuler spesifik untuk KSSRM yang mempunyai hubungan kuat dengan gambaran HPA KSSRM. Sementara GST p16 ekson 1 dapat dijadikan indikator diagnosis dini dan prognosis molekuler spesifik untuk KSSRM yang bermanfaat untuk upaya pencegahan, menunjang diagnosis klinis dan HPA serta strategi penanganan penderita KSSRM akan menjadi lebih tepat dan akurat



2. Perlu dilakukan *sequencing* pada daerah *hot spot* ekson 5-9 serta *GST p16* pada *hot spot region* ekson 1-3 untuk lebih dapat menjelaskan dan meningkatkan pemahaman dasar molekuler kanker rongga mulut
3. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai perubahan aktivitas gen-gen lainnya yang terlibat dalam mekanisme perubahan aktivitas *GST p53* dan *GST p16* seperti *p21*, *p27* dan *pRb* yang ikut berperan dalam siklus sel kanker rongga mulut
4. Dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai faktor resiko penting lainnya adalah virus seperti HPV dan EBV yang selalu terlibat dalam proses terjadinya kanker rongga mulut yang bermanfaat dalam meningkatkan dan mengkonfirmasi hasil temuan yang didapat dari penelitian ini



## DAFTAR PUSTAKA

- Agus P, 1990. Karsinoma sel skuamosa pada Bibir. *Jurnal Kedokteran Gigi*. April, Th 93, No1, hlm 43-49
- Agus P, 1995. Distribusi Karsinoma Epidermoid Lidah. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga*, Vol 3, No1, hlm 14 - 24.
- Adam PD, Kaelin WG, 1998 Negative control elements of the cell cycle. In human tumors, *Curr Opin Cell Biol* 10:791-797.
- Brown TA, 1989. *Genetics A Molecular Approach*. London: Van Nostrand Reinhold (International ) Co Ltd.
- Bishop JM, 1991. Molecular Themes in Oncogenesis. *Cell* 64, pp 235
- Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G, Coggi G, 1995. Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphism (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and nonradioactive silver-stained SSCP analysis. *Diagn Mol Pathol* 4:249-255.
- Bartek J, Bartkova J, Lukas J, 1996 . The retinoblastoma pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol* 8:806-814.
- Bartkova J, Lukas J, Bartek J, 1997. Aberration of the G<sup>1</sup> and G<sup>1</sup>/S regulating genes in human cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3:211-220.
- Bockmull U, Wolf G, Schmidt S, Sewendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I, 1998. Genomic alteration associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* Mar 20:145-51.
- Brantley MA Jr, Harbour WJ, 2001 The Molecular biology of retinoblastoma *Ocul Immunol Inflamm* 9:1-8
- Chen YH, Li CD, Yap EP, McGee JO, 1995. Detection of loss of heterozygosity of p53 gene in paraffin-embedded breast cancers by non-isotopic PCR-SSCP. *J Pathol* 177:129-134.
- Chen GS and Chen CH, 1996. A study on survival rates of oral squamous cell carcinoma. *J Kao-Hsiung-I-Hsueh-Ko-Hsueh-Tsa-Chih* 12 317-325
- Coleman KG, Wautlet BS, Morrissey D, Mulheron J, Sedman SA, Brankley P, Price S, Webster KR, 1997 Identification of CDK4 Sequences Involved in Cyclin D1 and p16 Binding *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 25:18869-18874

- Cornellisse CJ, 1998. Oncogene and tumor suppressor genes. In , *Modern Pathology for Service and Research on Cancer*, Surabaya, pp 65-70.
- Crowford JT, 1998. Molecular Approaches to the Detection on Mycobacteria. In (Gangadharam PRJ and Jenkins PA, eds). *Mycobacteria. 1, Chemoterapy* London ; Chapman and Hall, pp 131-144.
- Chaves AC, Cherubini K, Herter N, Furian R, Santos DS, Squier C, Domann FH, 2004. Characterization of p53 gene mutations in Brazillian population with oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 24:295-303.
- Desai PB, 1994. Cancer Control Effort in India with Specific Reference to Oral Cancer. *Oral Oncology, Therapy*, Vol III B. Varma, pp 259 - 264.
- Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, 1998. Alteration of the p16-pRb Pathway and the Chromosome Locus 9p21-22 in Non-Small-Cell Lung Carcinomas *Am J Pathol* 153:1749-1765
- Grander D, 1998. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer, In (Wiernick PH, Osterborg A eds), *Medical oncology* 15:20-26.
- Godsell DS, 1999. The Molecular Perspective. p53 Tumor Suppressor, *The Oncologist* 4:138-139.
- Hermanek P, 1995. *Prognostic Factors in Cancer*. UICC Ed, New York : M5CC.
- Hood Yulianti, 1995. Peran Patologi pada Kanker Rongga Mulut (Epidemiologi, Deteksi dini dan Problema Diagnostik), Surabaya: Pertemuan Ilmiah Tahunan, PERABOI IX, hlm 70-82.
- Haupt Y, Oren M. 1996. p53-Mediated Apoptosis Mechanism and Regulation *Behring Inst Mitt* 97:32-59.
- Harbour JM, Dean DC, 2000. The Rb /E2F pathway. Expanding roles and emerging paradigms, *Gene and Development* 14:2393-2409.
- He XS, Su Q, Chen ZC, He XT, Long ZF, Ling H, Zhang LR, 2001. Expression, deletion and mutation of p16 gene in human Gastric cancer *World J Gastroenterol* 7:515-521.
- Hu N, Huang J, Buck MRE, Tang ZZ, Roth MJ, Wang C, Dawsey SM, Li Guang, Li WJ, Wang QH, Han XY, Ding T, Giffen C, Goldstein AM, Taylor PR. 2001. Frequent Inactivation of the TP53 Gene in Esophageal Squamous Cell Carcinoma from a High-Risk Population in China. *Clin Cancer Res* 7:883-891.

- Hsieh J.L., Wang FP, Chen HL, Liao TC, Wang MH, Chen CM, Chang CJT, Cheng JA, 2001. Characteristic of mutation in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid in chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis* 22:1497-1503.
- Jares P, Fernandes PL, Hadal A, Cazaria M, Hernandez L, Pinyol M, Hernandez S, Traseria J, Cardesa A, Campo E, 1997. P16MTS1/CDK41 mutation and concomitant loss of heterozygosity at 9p21-23 are frequent events in squamous cell carcinoma of the larynx. *Oncogene* 15:1445-53.
- Kusama K, Okutsu S, Takeda A, Himiya T, Kojima A, Kidokoro Y, Chu L, Iwanari S, Kudo I, Moro I, 1996. p53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Pathol* 178:415-21
- King RJB, 1996. *Cancer biology 1<sup>st</sup> Ed* England Longman Ltd, pp 1-7.
- King KT, Cidlowsky JA, 1998. Cell Cycle Regulation and Apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60:601-617.
- Konstantinidis A K, Radhakrishnan K, Gu F, Rao RN, Yeh KY, 1998. Purification, Characterization and Kinetic Mechanism of cyclin D1 Cdk4 a Mayor target for cell cycle regulation, *J Biol Chem* 273 :26506-26515.
- Kuo MY, Huang JS, Hsu HC, Chiang KP, Kok SH, Kuo YS, Hong CY, 1999. Infrequent p53 mutations in patients with area quid chewing-associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Pathol Med* 28 :221-225.
- Kropveld A, Rosenmuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, Hordijk GJ, Slootweg PJ, Tilanus MG, 1999. Sequencing analysis of RNA and DNA of Exon 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Lab Invest* 79: 347-353.
- Kannan S, Yokozaki H, Jayasree K, Sebastian P, Mathews A, Abraham FK, Nair MK, Tabara E, 2000. Infrequent loss of heterozygosity of the major tumour suppressor genes in Indian oral cancers. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 :414-418.
- Kannan K, Munirajan AK, Krishnamurthy J, Bhuvaramurthy V, Mohanprasad BK, Panishankar KH, Tsuchida N, Shanmugam G, 2000. The p16 alpha/p19ARF gene mutations are infrequent and are mutually exclusive to p53 mutations in Indian oral squamous carcinoma. *Int J Oncol Mar* 16:585-590
- Keshava C, Frye BL, Wolff MS, Mc Carries EC, Weston A, 2002. Waf-1 (p21) and p53 Polymorphism in Breast Cancer, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* Jan 11:127-130



- Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'donoghue DP, Parfrey NA, 1996. Prognostic Significance of p53 Abnormalities in Colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and Immunohistochemical analysis *J of Pathol* 180:364-370.
- Lam KY, Tsao SW, Zang D, Law S, He D, Ma L, Wong J, 1997. Prevalence and predictive value of P53 mutation in patients with oesophageal squamous cell carcinomas. a prospective clinico-pathological study and survival analysis of 70 patients, *Int J Cancer* 74:212-219.
- Lundberg AS, Weinberg KA, 1998. Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at least Two Distinct Cyclin-Cdk Complexes *Mol Cell Biol* 18:753-761
- Loggett Jr, Sidransky D, 1988. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer *Journal of Clinical Oncology* 16:1197-1206.
- Lang JC, Tobin EJ, Knobloch TJ, Schuller DE, Bartynski KJ, Mountain RE, Nicholson R, De Young BR, Weghorst CM, 1998. Frequent mutation of p16 in squamous cell carcinoma of the head and neck, *Laryngoscope* 108:923-928.
- Lodish H, Berk A, Zipursky LS, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J, 2000. *Molecular Cell Biology*. 4<sup>th</sup> Ed. New York. W.H Freeman and Co, pp 246-293.
- Luo SC, Chang KW, Chang CS, Liu TY, Tzeng YS, Yang FS, Wong TK, 2000. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. *J Oral Pathol Med* 29:59-60
- Lingen MW, Chang KW, McMurray SJ, Solt DB, Kies MS, Mittal BB, Hainnes GK, Pelzer HJ, 2000. Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factor is not associated with mutation in exon 5-9 *Head Neck* 22:328-35
- Liu DS, Zhang ZH, Zhang CZ, 2002. Genetic alteration of p16 gene in oral and maxillofacial squamous cell carcinomas *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 11:226-228.
- Mullis K. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold-Spring Harbor Symp Quant Biol* 51:335-350.
- Murtedjo U, Reksoprawito S, Marwawinoto RM. 1995. Karsinoma Rongga Mulut, Surabaya. *Pertemuan Ilmiah Tahunan. PERABO IX*. hml39-152
- Matsunura K, 1995. Detection of DNA amplification and deletions in oral squamous cell cell lines by comparative genomic hybridization *Kokubyou Gakkai Zasshi* 62:513-531



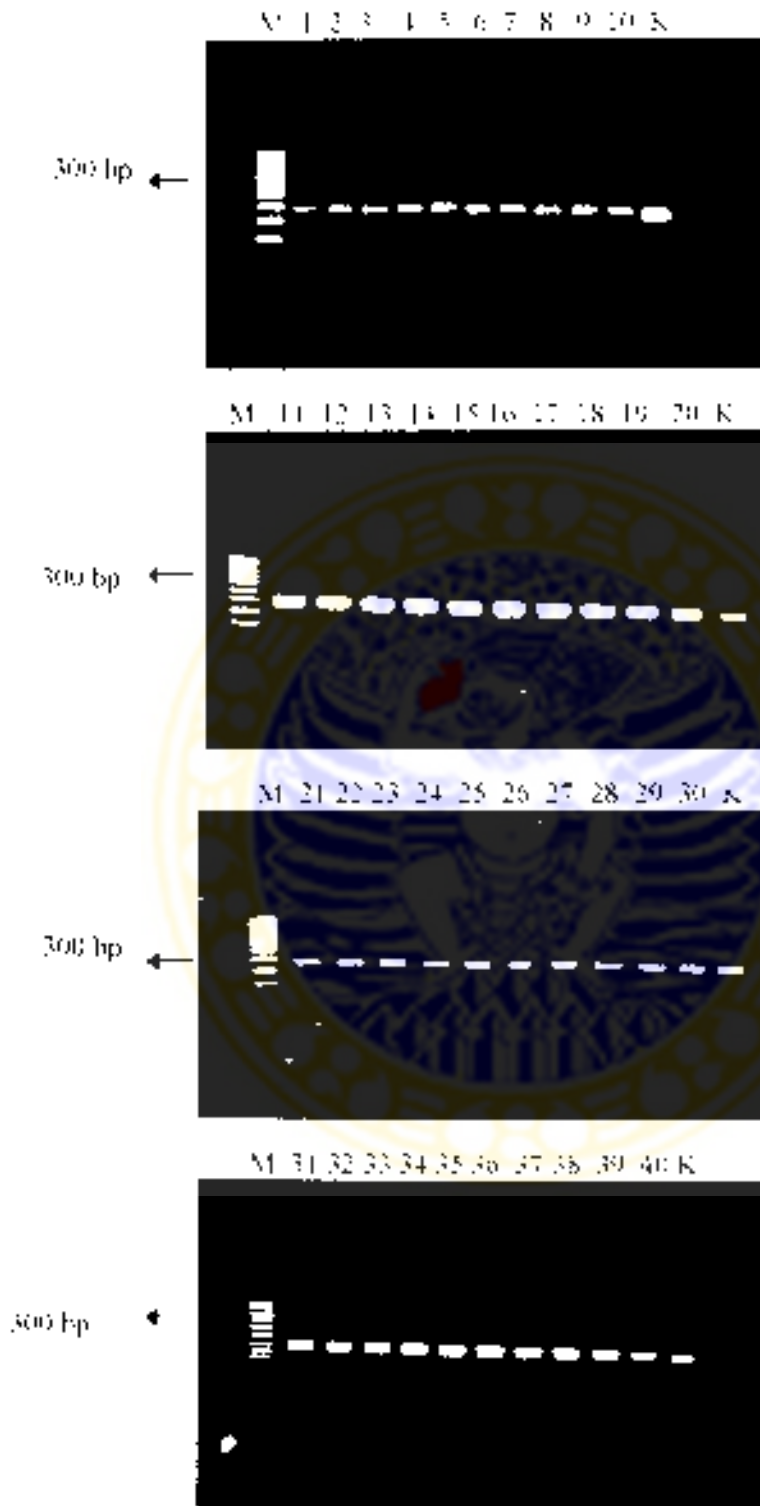
- Manuaba, Wibawa F. 1995. Problematik dan komplikasi dalam penatalaksanaan Karsinoma Rongga Mulut (KRM) di Laboratorium Bedah FK Unud/RSUP Denpasar. Surabaya: Pertemuan Ilmiah Tahunan, PERABOI IX, hlm.167-177.
- Matsumura T, Yoshihama Y, Kimura T, Sintani S, Acalde RJ. 1996. p53 and MDM2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology* 53: 308-312.
- Morgan DO. 1999. Cyclin Dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-291
- Mc Daniels-Silvers AL, Herzog CR, Tyson FL, Malkinson AM, You M. 2001. Inactivation of both Rb and p53 pathway in mouse lung epithelial cell lines. *Exp Lung Res* 27:297-318
- Nakagawa H, Zukerberg J, Togawa K, Metzger SJ, Nishihara T, Rustgi AK. 1995. Human cyclin D1 oncogen and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 76:541-548
- Naumann M, Stavitskaia N, Eilert C, Schramm A, Kalthoff H, Schmeigel W. 1996. Frequent codeletion of P16 MTS1 and p15 MTS2 and genetic alterations in p16/MTS1 in pancreatic tumors. *Gastroenterology* 110:215-224
- Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. 2000. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 29:413-425.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism. *Proc Natl Acad Sci* 86:2766-2770
- Oren M. 1999. Regulation of the p53 Tumor Suppressor Protein. *J Biol Chem* 274:36031-36034.
- Okami K, Reed A, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, Jen J, Sidransky D. 1999. Cyclin D1 amplification is dependent of p16 inactivation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncogene* 18:3541-3545
- Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gunlach K, Kundt G, Barten M. 2000. p53 mutational spectra are different between squamous cell carcinoma of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer* 88:82-86
- Pusztai L, Lewis CE, Yap F. 1996. Cell Proliferation in Cancer. Regulatory Mechanisms of Neoplastic Cell Growth. Oxford: Oxford University Press, pp.1-104
- Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. 1998. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 34:396-403

- Ramli M. 1995. Problematik bedah pada kanker rongga mulut Surabaya: Pertemuan Ilmiah Tahunan. PERABOI IX, hlm1-17
- Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WIL, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Banek J, Sidransky D. 1996. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56:3630-3633.
- Papp T, Pemsel H, Weiss DG, Schiffmann D. 1997. Simultaneous detection of homozygous deletion and point mutation in tumor suppressor genes p16 and p53 by multiplex - PCR-SSCP analysis. Elsevier Trends Journals Technical Tips Online. Available from URL:[http://to.trends.com/cgi-bin/ctto..to?pl.pg\\_ssr.cgi?sid\\_search?8849](http://to.trends.com/cgi-bin/ctto..to?pl.pg_ssr.cgi?sid_search?8849)
- Ramli M. 1999. Factors Affect The Treatment of Oral Cancer. Vol XXVII, No1, Ropanasuri. hlm 61-70
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. New York : Cold Spring Laboratory Press, pp 6.4-6.60,14.2-14.35.
- Sidransky D. 1995. Molecular genetics of Head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*:229.
- Soehandini. 1995. Kemoterapi Kanker Rongga Mulut Surabaya : Pertemuan Ilmiah Tahunan. PERABOI IX, hlm 95-103
- Soekardja DDG. 1996. *Onkologi Klinik Surabaya*. Airlangga University Press, hlm1-268.
- Sherr CJ. 1996. *Cancer Cell Cycle Science* 274:1672-1677
- Sherr CJ. 1998. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Gene & Development* 12:2984-2991
- Sartor M. 1999. Role of p16/MTS1, siklin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum Pathol* 30:1013-1018
- Shigemasa K, Tanimoto H, Parham GP, Parmley TH, Ohama K, O'Brien LJ. 1999. Cyclin D1 overexpression and p53 mutation status in epithelial ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig* 6:102-108
- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitor: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes and Development* 13:1501-1512
- Shahnavaiz SA, Regezi JA, Bradley G, Dube HJ, Jordan RC. 2000. p53 gene mutation in sequential oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinomas. *J Pathol* 190:417-422

- Shahnavaz SA, Bradley G, Regezi JA, Thakker N, Gao L, Hogg D, Jordan RCK, 2001. Patterns of CDKN2A gene Loss in Squential Oral Epithelial Dysplasias and Carcinomas *Cancer Res* 61:2371-2375.
- Somasundaram K, El-Deiry WS, 2000. Tumor supressor p53 Regulation and Function. *Frontiers in Bioscience* 1:424-437.
- Sherr CJ, 2000 The Pezcoller Lecture. Cancer cell cycles. Revisited *Cancer Res* 60:3689-3695
- Suryohudoyo P, 2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Jakarta Kapita Selekta, CV.SAGUNG SETO, hlm102-109
- Sandal T, 2002. Molecular Aspect of The Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist* 7:73-81.
- Todd R, Donoff Rb, Wong DTW, 1997. The Molecular Biology of Oral Carcinogenesis. Toward a tumor progression model, *JOMS* 55:613.
- Trivedy C, Wanakulasuriya KA, Tavassoli M, Steingrimsdottir H, Penhallow J, Maher R, Johnson NW, 1998. p53 aberration in oral sub mucosa fibrosis and oral squamous cell carcinoma detected by immunocytochemistry and PCR-SSCP. *J Oral Pathol Med* 27:72-77.
- Tsiblias J, Kapusta L, Slingerland J, 1999. The Prognostic significant of altered cyclin-dependent kinase inhibitor in human cancer. *Annu. Rev Med* 50:401-423.
- Tsuda H, Yamamoto K, Inoue T, UchiyamaJ, Umesaki N, 2000 The Role of P16-cyclin D/CDK-pRb pathway in the tumorigenesis of endometrioid-type endometrial carcinoma, *Br J Cancer* 82:675-682.
- Tsai HC, Yang CC, Chou S-Shin I., Chou YM, 2001. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma *J Oral Pathol & Med* 30:527-531
- Vecchia LC, Tavani A, Francheschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. 1997. *Epidemiology and Prevention of Oral Cancer* 33:302-312.
- Vofkmann M, Stigenbauer F, Hoffmann, Otto G, Schiff JH, Fiehn W, 1999. CDKN2 Mutation is infrequent in German hepatocellular caremoma. *Oncology* 57:306-310
- WHO, 1979 WHO Handbook for reporting results of cancer treatment WHO Geneva
- WHO, 1997. World Health Organization warns of growing "crisis report conquiring suffering " Facts from the world health report, pp 1-5.

- Wang TH, Wang HS, 1997. p53, Apoptosis and Human Cancers. *J Formos Med Assoc* 95:509-522.
- Wu CL, Roz L, McKown S, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, Scully C, Paterson I, Tavassoli M, Thakker N, 1999. DNA studies underestimate the mayor role of CDK2A inactivation in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 25:16-25.
- Williams WK, 2000. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Mol Pathol* 53:165-172.
- Yeudal WA, Yakus J, Ensley JF, Robbins KC, 1997. Functional characterization of p53 molecules in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Carcinog* 18:89-96.
- Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Fukuda H, 2003. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39:163-169.
- Zhou G, Liang C, Lin D, Zhang X, Wen D, Liu Y, 1998. Relationship between tumor cell proliferating activity and biological behavior, prognosis in laryngeal carcinoma. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 29:178-181.
- Zakrzews JM, 1999. Oral Cancer. Clinical review, *BMJ* 318:1051-1054.
- Zainuddin M, 1999. Metodologi Penelitian, Pasca Sarjana Universitas Airlangga, hlm102.
- Zhang X, Liu S, Zhou G, Liang C, Lin D, Qiao X, 2000. Experimental studies on Exon 5-8 of p53 gene mutation in laryngeal squamous cell carcinoma, *Hua Xie Yi Ke Da Xue Xue Bao* 31:295-297.

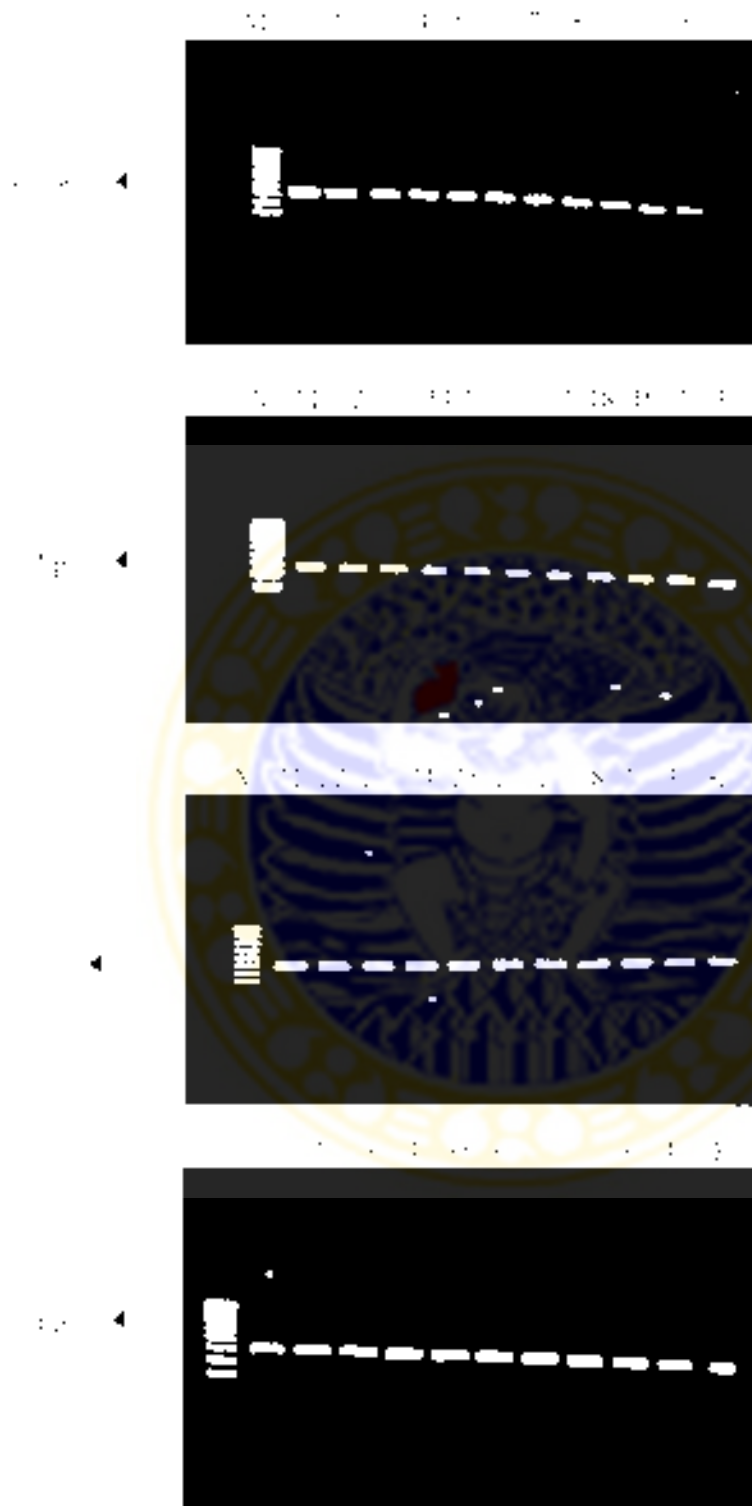
### Lampiran 1: Hasil Produk PCR GST p53 ekson 5 pada KSRM



Hasil produk optimasi PCR GST p53 ekson 5 sampel No. 1 sampai No. 40 dan kontrol mengandung 1 µl pta DNA dengan ukuran 300 bp sesuai dengan marker *Lambda*isasi dengan pewarnaan *Ethidium Bromide*.

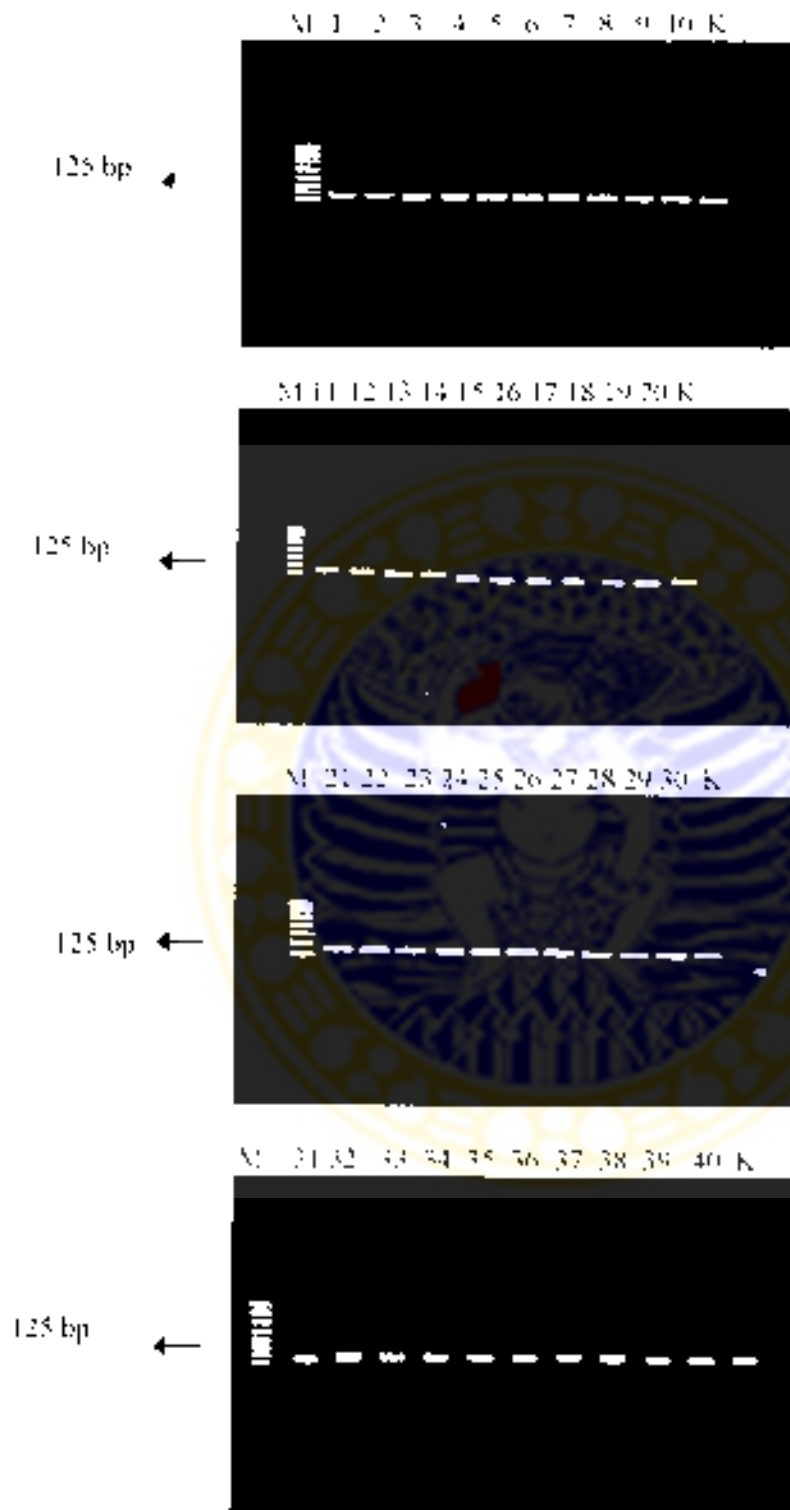


Lampiran 2. Hasil Produk PCR GSt p53 ekson 7 pada KSRM



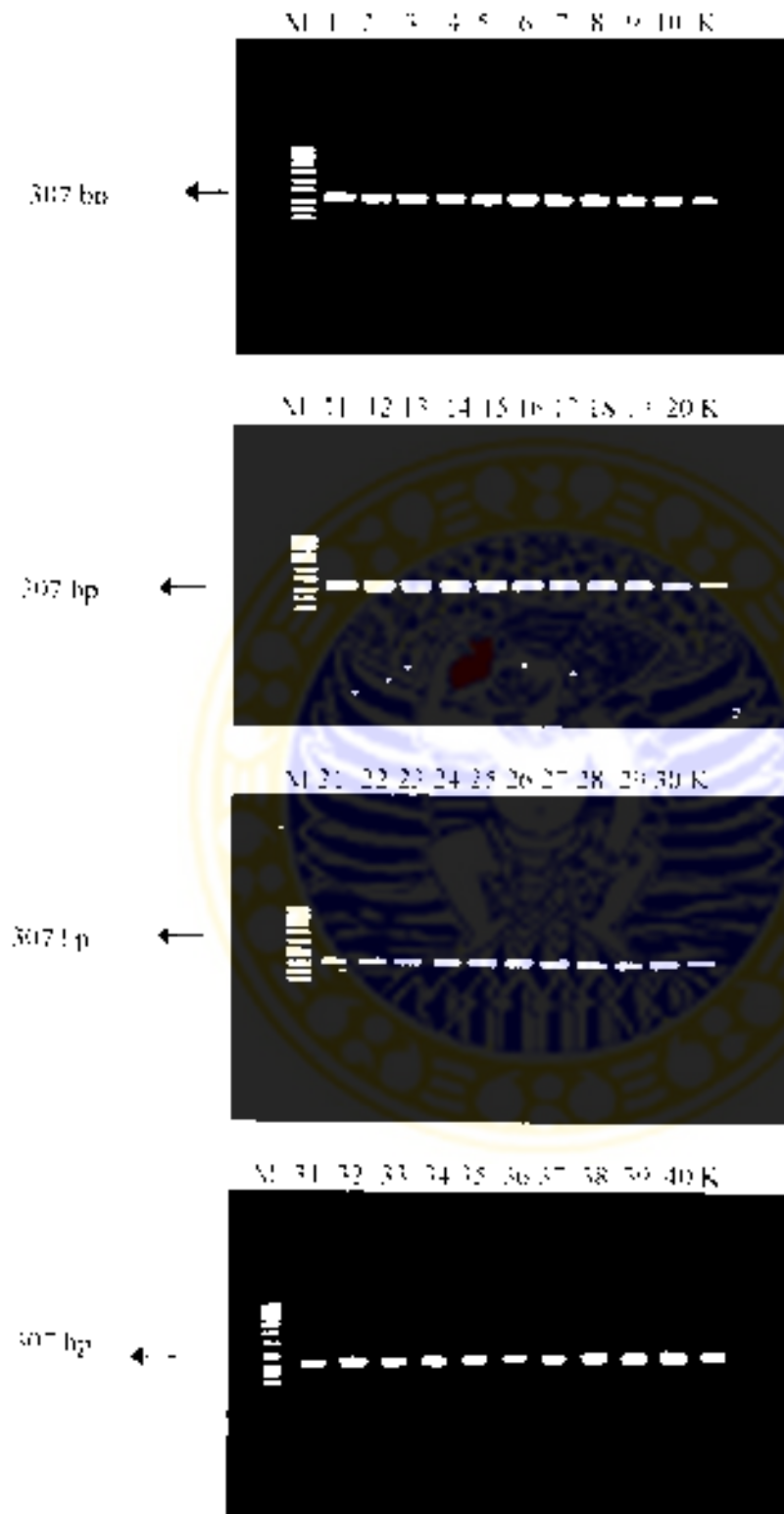
ADLN (ADLNs) is a digital library of Unair's journals, books, and other publications. It is a free and open access platform for Unair's digital library. ADLN is a digital library of Unair's journals, books, and other publications. It is a free and open access platform for Unair's digital library. ADLN is a digital library of Unair's journals, books, and other publications. It is a free and open access platform for Unair's digital library.

### Lampiran 3: Hasil Produk PCR GST p16 ekson 1 pada KSRM



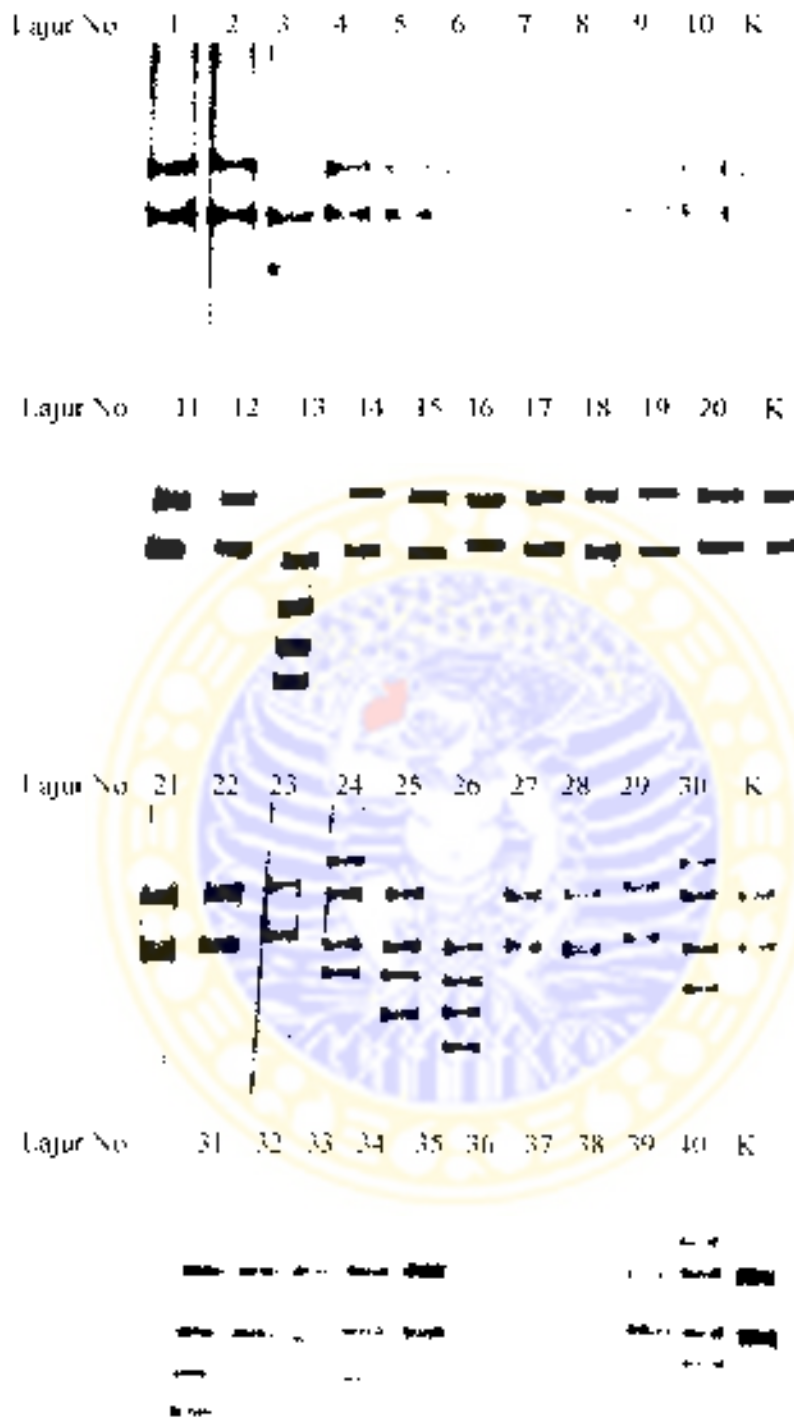
Hasil produk optimasi PCR GST p16 ekson 1 sampel Nstl sampai No 40 dan kontrol menggunakan ipita DNA dengan ukuran 125 bp sesuai dengan marker visualisasi dengan pewarnaan *ethidium bromide*.

## Lampiran 4: Hasil Produk PCR GST p16 ekson 2 pada KSSRM

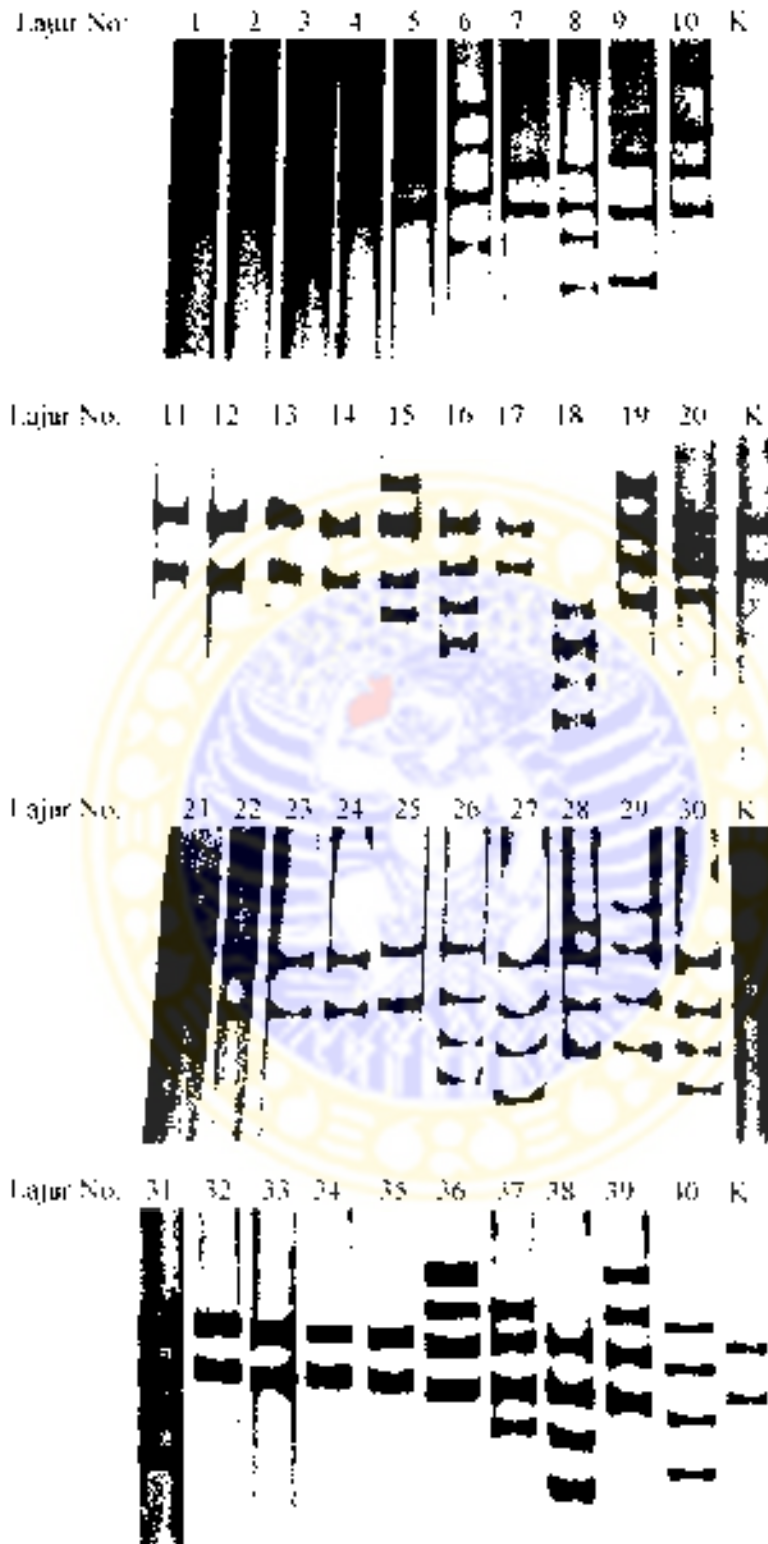


Hasil produk amplifikasi PCR GST p16 ekson 2 sampel NRI sampel No 40 dan kontrol menunjukkan 1 pita DNA dengan ukuran 128 bp sesuai dengan marker visualisasi dengan pewarnaan *ethidium bromide*.

**Lampiran 5: Hasil PCR-SSCP GST p53 ekson 5 pada KSSRM**



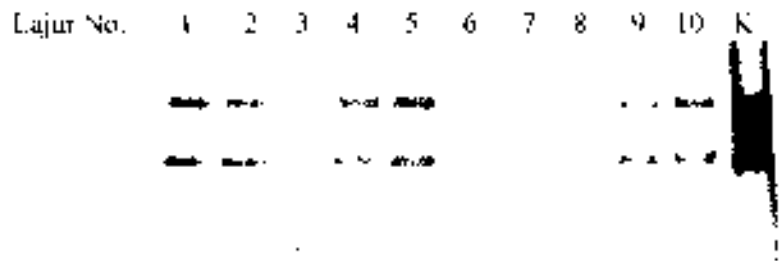
Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 5 dari sampel lajur nol sampai lajur No 40 beserta kontrolnya (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).

**Lampiran 6: Hasil PCR-SSCP GST p53 ekson 7 pada KSSRM**

Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p53 ekson 7 dari sampel lajur nol sampai lajur No 40 beserta kontrolnya (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)



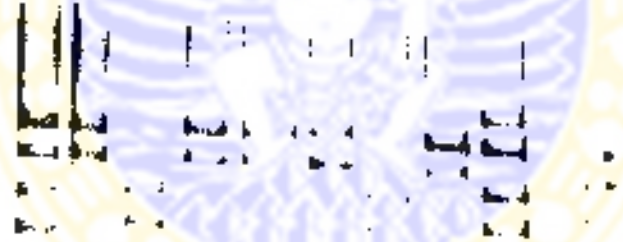
**Lampiran 7: Hasil PCR-SSCP GST p16 ekson 1 pada KSSRM**



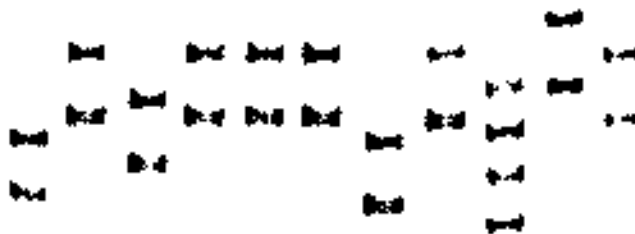
Lajur No: 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 K



Lajur No. 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 K

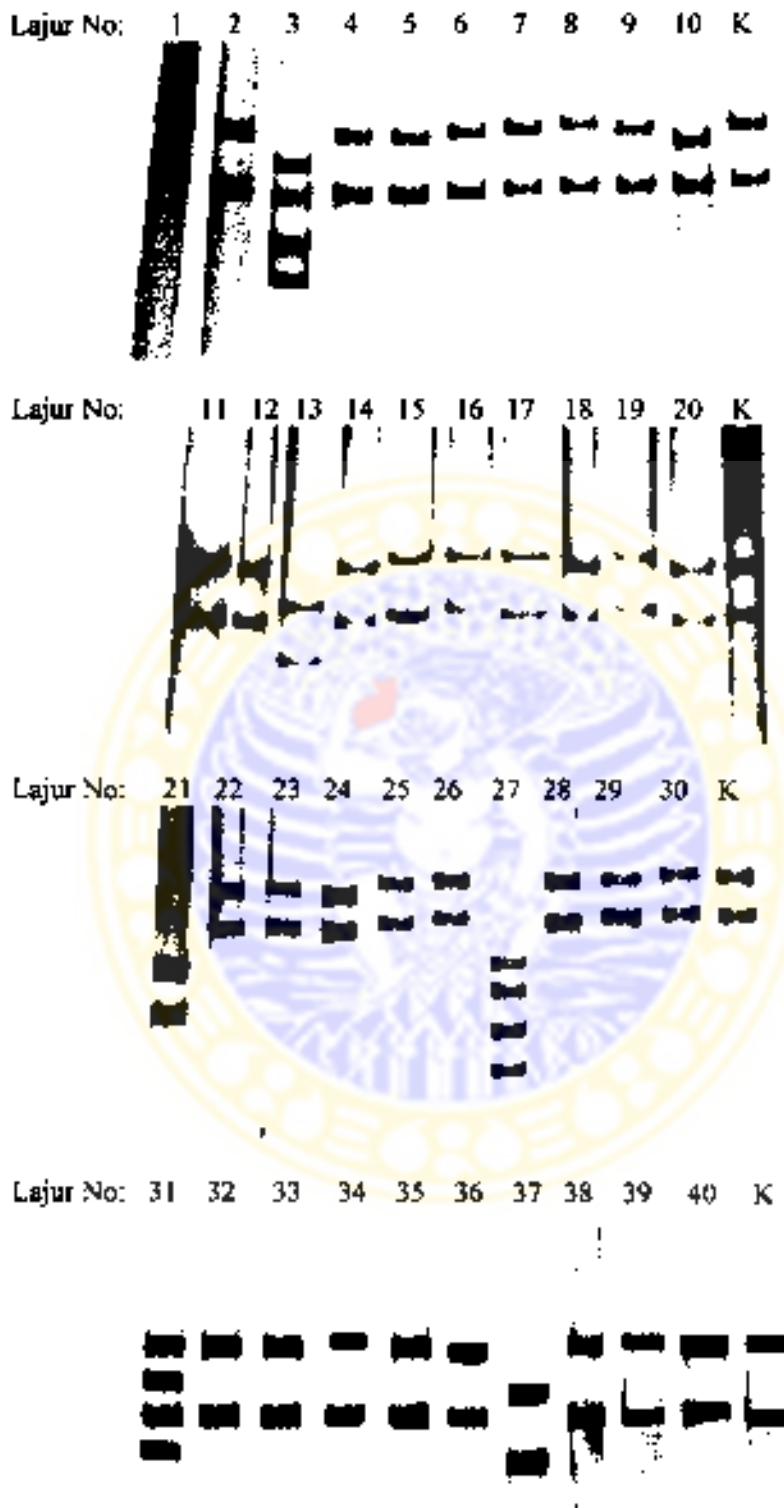


Lajur No: 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 K



Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 1 sampel lajur No 1 dan No-40 serta kontrolnya (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat)

**Lampiran 8: Hasil PCR-SSCP GST p16 ekson 2 pada KSSRM**



Hasil PCR-SSCP sampel KSSRM untuk GST p16 ekson 2 sampel lajur No 1 dan 40 serta kontrolnya (visualisasi dengan pengecatan perak nitrat).

**Lampiran 9: Data Hasil Penelitian Observasional Gambaran Klinis dan Histopatologis KSSRM dengan Mutasi p53 dan p16**

NO	U	U/P	LOKASI	R/N	TNM	ST. KL	KPA W/P	MUTASI p53			MUTASI p16			MUTASI	
								E.5	E.7	K	E1	E2	K	p53	p16
1	48	L	Gusi	+	T1N0M0	I	W	0	0	0	0	0	0	0	0
2	50	P	Gusi	-	T1N0M0	I	W	0	0	0	0	0	0	0	0
3	45	P	Lidah	+	T2N0M0	II	W	1	0	0	1	1	0	1	1
4	49	L	Gusi	-	T2N0M0	II	W	0	0	0	0	0	0	0	0
5	52	P	Palatum	+	T2N0M0	II	W	0	1	0	0	0	0	1	0
6	55	L	Lidah	+	T2N0M0	II	W	0	1	0	1	0	0	1	1
7	59	L	Gusi	+	T2N0M0	II	W	0	0	0	0	0	0	0	0
8	60	P	Palatum	-	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
9	60	L	Lidah	+	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
10	62	L	Lidah	-	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
11	47	L	Palatum	-	T1N0M0	I	W	0	0	0	0	0	0	0	0
12	50	P	Gusi	-	T1N0M0	I	W	0	0	0	0	0	0	0	0
13	46	P	Lidah	+	T2N0M0	II	W	1	0	0	1	1	0	1	1
14	48	L	Gusi	-	T2N0M0	II	W	0	0	0	0	0	0	0	0
15	53	P	Palatum	+	T2N0M0	II	W	0	1	0	0	0	0	1	0
16	56	L	Lidah	+	T2N0M0	II	W	0	1	0	1	0	0	1	1
17	59	L	Gusi	+	T2N0M0	II	W	0	0	0	0	0	0	0	0
18	60	P	Palatum	+	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
19	61	L	Lidah	+	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
20	62	L	Lidah	-	T2N1M0	III	W	0	1	0	0	0	0	1	0
21	46	L	Lidah	+	T2N1M0	III	P	0	1	0	1	1	0	1	1
22	50	L	Lidah	+	T3N1M0	III	P	0	0	0	0	0	0	0	0
23	54	P	Gusi	-	T3N1M0	III	P	0	0	0	1	0	0	0	1
24	55	L	Lidah	+	T3N1M0	III	P	1	0	0	0	0	0	1	0
25	62	L	Lidah	-	T3N1M0	III	P	1	0	0	0	0	0	1	0
26	65	P	Palatum	+	T3N1M0	III	P	1	1	0	0	0	0	1	0
27	51	L	Lidah	+	T4N1M0	IV	P	0	1	0	1	1	0	1	1
28	56	P	Palatum	+	T4N2M0	IV	P	0	1	0	0	0	0	1	0
29	60	P	Gusi	+	T4N1M0	IV	P	0	1	0	1	0	0	1	1
30	62	L	Lidah	+	T4N2M0	IV	P	1	1	0	1	0	0	1	1
31	47	L	Lidah	+	T2N1M0	III	P	1	1	0	1	1	0	1	1
32	51	L	Lidah	+	T3N1M0	III	P	0	0	0	0	0	0	0	0
33	54	P	Gusi	-	T3N1M0	III	P	0	0	0	1	0	0	0	1
34	57	L	Lidah	+	T3N1M0	III	P	1	0	0	0	0	0	1	0
35	60	L	Lidah	-	T3N1M0	III	P	1	0	0	0	0	0	1	0
36	64	P	Palatum	+	T3N1M0	III	P	1	1	0	0	0	0	1	0
37	52	L	Lidah	+	T4N1M0	IV	P	0	1	0	1	1	0	1	1
38	56	P	Palatum	+	T4N2M0	IV	P	0	1	0	0	0	0	1	0
39	61	P	Gusi	+	T4N1M0	IV	P	0	1	0	1	0	0	1	1
40	62	L	Lidah	+	T4N2M0	IV	P	1	1	0	1	0	0	1	1

**Keterangan:**

No= Nomor urut penderita

U = Usia, L/P - Laki/Perempuan,

R/N = Rokok/Nginang,

TNM = Tumor, Noduli, Metastases, ST KL - Stadium Klinis ,

W = *Well differentiated* (diferensiasi baik),

P - *Poorly differentiated* diferensiasi jelek),

E.5 = Ekson 5, E.7 - Ekson 7, K = Kontrol

Lampiran 10: *Ethical Clearance*




**PANITIA KELAIKAN ETIK  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
( "ETHICAL CLEARANCE" )**

---

No. 04/Fanke.EKE/2003

PANITIA KELAIKAN ETIK FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA - RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA, TELAH MEMPelajari SECARA BERSAMA BANGUNAN PENELITIAN YANG DIBESUKAN. MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN BERJUDUL :

" Analisis Molekuler Patogenesis Pada Karsinoma Sel Silindris Rongga Mulut Berdasarkan Pola Mutasi Gen p53 dan p16 " (Dengan Pendekatan Biologi Molekuler)

PEMELIH UTAMA: Drg. Peter Agus, SpB

UNIT (LEMBAGA) / TEMPAT PENELITIAN: RSUD Dr. Soetomo Surabaya

**DINYATAKAN LAIB ETIK.**

SURABAYA, ..... 2003

KETUA 1

.....  
Prof. dr. H. S. Mariani, SpOG-KPM

## **Lampiran 11: Lembar Penjelasan Tentang Prosedur Penelitian di Laboratorium Bedah Mulut FKG Unair.**

### **A. Prosedur pengambilan sebagian kecil jaringan normal yang berlebihan.**

Pengambilan sebagian kecil jaringan normal pada penderita yang telah di operasi gigi geraham ketiga rahang bawah atau rahang atas dengan lokasi tertanam, pada umumnya setelah dilakukan operasi terdapat kelebihan jaringan pada saat penutupan luka operasi sehingga diperlukan prosedur pengambilan sebagian kecil jaringan normal sesuai kebutuhan agar penutupan luka terlihat baik sekaligus mempercepat penyembuhan luka (sesuai dengan prosedur tetap penanganan penderita dengan indikasi operasi gigi geraham ketiga tertanam baik rahang atas dan bawah di Bagian Bedah Mulut FKG UNAIR). Dari sebagian jaringan normal ini akan dilakukan pemeriksaan genetik untuk mengetahui apakah ada tidaknya kerusakan genetik sebab kerusakan genetik yang terjadi akan dapat menimbulkan tanda adanya keganasan dini pada rongga mulut.

### **B. Prosedur Pengobatan**

Pengobatan pada penderita setelah operasi dilakukan sesuai dengan prosedur tetap penanganan penderita dengan indikasi operasi gigi geraham ketiga tertanam baik rahang atas dan bawah di Bagian Bedah Mulut FKG UNAIR. Tidak ada penambahan maupun pengurangan obat maupun tindakan pengobatan dalam penelitian ini.

### **C. Tujuan dan Manfaat Penelitian**

Adapun tujuan penelitian ini secara garis besar adalah untuk mengadakan penilaian laboratorik (DNA) pada jaringan normal sehingga dapat diketahui ada tidaknya faktor genetik yang berpengaruh terhadap timbulnya keganasan dini pada kanker rongga mulut. Apabila terbukti ada kerusakan genetik maka manfaat penelitian ini adalah untuk mencegah timbulnya keganasan dini rongga mulut sehingga dapat menurunkan angka kecacatan dan kematian penderita.



**Lampiran 12: Lembar Persetujuan Untuk mengikuti Penelitian di  
Laboratorium Bedah Mulut FKG Unair  
( INFORMED CONSENT )**

**Pernyataan Persetujuan Untuk mengikuti Penelitian**

Setelah mendengar dan memahami semua penjelasan yang diberikan berkaitan dengan prosedur penelitian yang akan dilakukan serta tujuan dan manfaat penelitian ini maka dengan ini kami bersedia dengan sukarela agar / Suami/ Istri / Bapak / Anak / Saudara ..... saya ikut dalam penelitian ini seperti yang telah dikemukakan diatas dan seperti yang dijelaskan kepada saya dan oleh Staf Dokter Gigi Spesialis Bedah Mulut FKG Unair. Saya telah diberitahu bahwa setiap saat saya dapat mengeluarkan anggota keluarga saya dari penelitian ini, apabila saya menghendaknya. Semua pertanyaan saya telah dijawab secara memuaskan dan saya telah mendapatkan salinan (*copy*) lembar informasi pasien yang telah saya baca dan saya pahami.

Saya mengerti bahwa jika kelak ada pertanyaan lain , saya dapat menghubungi drg. Peter Agus SpBM pada telepon 031- 5932773 atau HP 081 2302 5600.

Demikian pernyataan ini kami buat dengan sebenarnya dan penuh kesadaran serta tanpa paksaan

Saksi,

Surabaya.....,2003

Yang membuat pernyataan  
Tanda Tangan/Cap ibu jari

Keluarga/ Wakilnya yang sah  
menurut Hukum

(..... )

(.....)

Mengetahui :

Peneliti

( drg.Peter Agus SpBM )

### **Lampiran 13. Lembar Penjelasan Prosedur Penelitian di RSUD Dr.Sutomo** **Penjelasan Tentang Prosedur Penelitian di RSUD Dr Sutomo**

#### **A. Prosedur Pengambilan Sebagian Kecil Jaringan Kanker Rongga Mulut**

Pengambilan sebagian jaringan pada penderita kanker rongga mulut yang telah dilakukan biopsi ataupun operasi sesuai kebutuhan penelitian Prosedur Biopsi ataupun operasi yang dilakukan pada penderita kanker rongga mulut yang datang pada Poli: SMF THT RSUD Dr. Sutomo dan Gedung Bedah Pusat Terpadu /GBPT RSUD Dr. Sutomo (sesuai dengan prosedur tetap penanganan penderita Kanker Rongga Mulut di RSUD Dr. Sutomo dengan indikasi biopsi ataupun operasi). Dari sebagian jaringan kanker ini akan dilakukan pemeriksaan genetik (DNA) untuk mengetahui apakah ada tidaknya faktor genetik yang berperan penting sebagai penyebab kerusakan genetik yang berat sehingga dapat menyebabkan kanker rongga mulut baik pada tahap awal awal maupun tahap lanjut.

#### **B. Prosedur Pengobatan**

Pengobatan pada penderita setelah biopsi ataupun operasi kanker rongga mulut sesuai dengan prosedur tetap penanganan pasca biopsi / tindakan bedah penderita kanker rongga mulut yang datang pada Poli: SMF RSUD Dr. Sutomo THT dan Gedung Bedah Pusat Terpadu /GBPT RSUD Dr. Sutomo. Tidak ada penambahan maupun pengurangan obat maupun tindakan pengobatan dalam penelitian ini.

#### **C. Tujuan dan Manfaat Penelitian**

Adapun tujuan penelitian ini secara garis besar adalah untuk mengadakan penelitian laboratorik (DNA) pada jaringan kanker sehingga dapat diketahui ada tidaknya faktor genetik yang berpengaruh terhadap timbulnya keganasan tahap awal dan tahap lanjut pada kanker rongga mulut. Apabila terbukti adanya faktor genetik yang berpengaruh terhadap kanker rongga mulut maka manfaat penelitian ini adalah untuk mendapatkan indikator diagnosa yang tepat, prediksi serta penanganan kanker rongga mulut bertamabah hak sehingga dapat menurunkan angka kesakitan, kecacatan serta kematian penderita

**Lampiran 14: Lembar Persetujuan Untuk mengikuti Penelitian di  
RSUD Dr Sutomo**

**( INFORMED CONSENT )**

**Pernyataan Persetujuan Untuk mengikuti Penelitian**

Setelah mendengar dan memahami semua penjelasan yang diberikan berkaitan dengan prosedur penelitian yang akan dilakukan serta tujuan dan manfaat penelitian ini maka dengan ini kami bersedia dengan sukarela agar / Suami/ Istri / Bapak / Anak / Saudara .....saya ikut dalam penelitian ini seperti yang telah dikemukakan diatas dan seperti yang dijelaskan kepada saya dan oleh Staf Dokter Spesialis THT RSUD Dr.Sutomo. Saya telah diberitahu bahwa setiap saat saya dapat mengeluarkan anggota keluarga saya dan penelitian ini, apabila saya menghendakinya. Semua pertanyaan saya telah dijawab secara memuaskan dan saya telah mendapatkan salinan (*copy*) lembar informasi pasien yang telah saya baca dan saya pahami.

Saya mengerti bahwa jika kelak ada pertanyaan lain, saya dapat menghubungi drg. Peter Agus SpBM pada telepon 031- 593 2773 atau HP 081 2302 5600.

Demikian pernyataan ini kami buat dengan sebenarnya dan penuh kesadaran serta tanpa paksaan

Saksi,

Surabaya.....,2003

Yang membuat Pernyataan  
Tanda Tangan/Capibu jari

Keluarga/ Wakilnya yang sah  
menurut Hukum

(.....)

(.....)

Mengetahui :

Peneliti

(drg.Peter Agus SpBM )

## Lampiran 15: Hasil Uji Statistik

## Crosstabs ; Uji Beda Mutasi GST p53 dan p16

Gen supresor tumor (GST) \* Mutasi KSSRM Crosstabulation

		Mutasi KSSRM		Total
		Tdk mutasi (-)	Mutasi (+)	
Gen supresor tumor P53 (GST)	Count	12	28	40
	Expected Count	19.0	21.0	40.0
	% within Gen supresor tumor (GST)	30.0%	70.0%	100.0%
	% within Mutasi KSSRM	31.6%	66.7%	50.0%
	% of Total	15.0%	35.0%	50.0%
P16	Count	26	14	40
	Expected Count	19.0	21.0	40.0
	% within Gen supresor tumor (GST)	65.0%	35.0%	100.0%
	% within Mutasi KSSRM	68.4%	33.3%	50.0%
	% of Total	32.5%	17.5%	50.0%
Total	Count	38	42	80
	Expected Count	38.0	42.0	80.0
	% within Gen supresor tumor (GST)	47.5%	52.5%	100.0%
	% within Mutasi KSSRM	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	47.5%	52.5%	100.0%

## Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9.825 <sup>b</sup>	1	.002		
Continuity Correction <sup>a</sup>	8.471	1	.004		
Likelihood Ratio	10.039	1	.002		
Fisher's Exact Test				.003	.002
Linear-by-Linear Association	9.702	1	.002		
N of Valid Cases	80				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 19.00.

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	.331			.002
Interval by Interval	Pearson's R	.350	.105	3.305	.001 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.350	.105	3.305	.001 <sup>c</sup>
N of Valid Cases		80			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

### Tests for Homogeneity of the Odds Ratio

Statistics		Chi-Squared	df	Asymp. Sig (2-sided)
Conditional Independence	Cochran's	9.825	1	.002
	Mantel-Haenszel	8.365	1	.004
Homogeneity	Breslow-Day	.000	0	
	Tarone's	.000	0	

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

### Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate		4.333	
ln(Estimate)		1.466	
Std. Error of ln(Estimate)		.478	
Asymp. Sig. (2-sided)		.002	
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	1.696
		Upper Bound	11.069
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	.529
		Upper Bound	2.404

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.



**Crosstabs: Uji Beda Mutasi GST p53 ekson 5 dan ekson 7****GST P53 \* Mutasi P53 Crosstabulation**

			Mutasi P53		Total
			Tdk mutasi (-)	Mutasi (+)	
GST P53	Ekson 5	Count	29	11	40
		Expected Count	23.5	16.5	40.0
		% within GST P53	72.5%	27.5%	100.0%
		% within Mutasi P53	61.7%	33.3%	50.0%
		% of Total	36.3%	13.8%	50.0%
	Ekson 7	Count	18	22	40
		Expected Count	23.5	16.5	40.0
		% within GST P53	45.0%	55.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	38.3%	66.7%	50.0%
		% of Total	22.5%	27.5%	50.0%
Total	Count	47	33	80	
	Expected Count	47.0	33.0	80.0	
	% within GST P53	58.8%	41.3%	100.0%	
	% within Mutasi P53	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	58.8%	41.3%	100.0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.241 <sup>a</sup>	1	.012		
Continuity Correction <sup>c</sup>	5.158	1	.023		
Likelihood Ratio	6.336	1	.012		
Fisher's Exact Test				.022	.011
Linear-by-Linear Association	6.163	1	.013		
N of Valid Cases	80				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16.50

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.269			.012
Interval by Interval Pearson's R	-.279	.107	-2.569	.012 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.279	.107	-2.569	.012 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	80			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Tests for Homogeneity of the Odds Ratio

Statistics		Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Conditional Independence	Cochran's	6.241	1	.012
	Mantel-Haenszel	5.093	1	.024
Homogeneity	Breslow-Day	.000	0	
	Tarone's	.000	0	

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

### Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate			310
ln(Estimate)			-1.170
Std. Error of ln(Estimate)			.476
Asymp. Sig. (2-sided)			.014
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.122
		Upper Bound	789
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-2.103
		Upper Bound	-.237

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1 (OR) assumption. So is the natural log of the estimate.

**Crosstabs: Uji Beda Mutasi GST p16 ekson 1 dan ekson 2****GST P16 \* Mutasi P16 Crosstabulation**

			Mutasi P16		Total
			Tdk mutasi (-)	Mutasi (+)	
GST P16	Exon 2	Count	34	6	40
		Expected Count	30.0	10.0	40.0
		% within GST P16	85.0%	15.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	56.7%	30.0%	50.0%
		% of Total	42.5%	7.5%	50.0%
	Exon 1	Count	26	14	40
		Expected Count	30.0	10.0	40.0
		% within GST P16	65.0%	35.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	43.3%	70.0%	50.0%
		% of Total	32.5%	17.5%	50.0%
Total	Count	60	20	80	
	Expected Count	60.0	20.0	80.0	
	% within GST P16	75.0%	25.0%	100.0%	
	% within Mutasi P16	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	75.0%	25.0%	100.0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4.267 <sup>b</sup>	1	.039		
Continuity Correction <sup>a</sup>	3.267	1	.071		
Likelihood Ratio	4.361	1	.037		
Fisher's Exact Test				.069	.035
Linear-by-Linear Association	4.213	1	.040		
N of Valid Cases	80				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10.00

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Sid. Error <sup>a</sup>	Approx T <sup>b</sup>	Approx Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.225			.039
Interval by Interval Pearson's R	-.231	.106	-2.096	.039 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.231	.106	-2.096	.039 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	80			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation.

### Tests for Homogeneity of the Odds Ratio

Statistics		Chi-Squared	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Conditional Independence	Cochran's	4.267	1	.039
	Mantel-Haenszel	3.226	1	.072
Homogeneity	Breslow-Day	.000	0	
	Tarene's	.000	0	

Under the conditional independence assumption, Cochran's statistic is asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution, only if the number of strata is fixed, while the Mantel-Haenszel statistic is always asymptotically distributed as a 1 df chi-squared distribution. Note that the continuity correction is removed from the Mantel-Haenszel statistic when the sum of the differences between the observed and the expected is 0.

### Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate		328	
ln(Estimate)		-1.116	
Std. Error of ln(Estimate)		.553	
Asymp. Sig. (2-sided)		.044	
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.111
		Upper Bound	.969
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-2.200
		Upper Bound	-.031

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

**Crosstabs: Uji Hubungan Umur dan Mutasi p53****Umur \* Mutasi P53 Crosstabulation**

			Mutasi P53		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	Count	4	7	11
		Expected Count	7.7	3.3	11.0
		% within Umur	36.4%	63.6%	100.0%
		% within Mutasi P53	14.3%	58.3%	27.5%
		% of Total	10.0%	17.5%	27.5%
51-60 th	51-60 th	Count	15	5	20
		Expected Count	14.0	6.0	20.0
		% within Umur	75.0%	25.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	53.6%	41.7%	50.0%
		% of Total	37.5%	12.5%	50.0%
>60 th	>60 th	Count	9	0	9
		Expected Count	6.3	2.7	9.0
		% within Umur	100.0%	.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	32.1%	.0%	22.5%
		% of Total	22.5%	.0%	22.5%
Total	Total	Count	28	12	40
		Expected Count	28.0	12.0	40.0
		% within Umur	70.0%	30.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	70.0%	30.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp Sig (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.022 <sup>a</sup>	2	.007
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	11.955	2	.003
Linear-by-Linear Association	9.556	1	.002
N of Valid Cases	40		

<sup>a</sup> 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.70

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp Sid Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.448			.007
Interval by Interval Pearson's R	-.495	.109	-3.512	.001 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.497	.111	-3.527	.001 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

<sup>c</sup> Based on normal approximation



**Crosstabs: Uji Hubungan Umur dengan Mutasi p 53 ekson 5****Umur \* Mutasi P53 Ekson 5 Crosstabulation**

			Mutasi P53 Ekson 5		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	Count	3	8	11
		Expected Count	3.0	8.0	11.0
		% within Umur	27.3%	72.7%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	27.3%	27.6%	27.5%
		% of Total	7.5%	20.0%	27.5%
51-60 th	Count	Count	3	17	20
		Expected Count	5.5	14.5	20.0
		% within Umur	15.0%	85.0%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	27.3%	58.6%	50.0%
		% of Total	7.5%	42.5%	50.0%
>60 th	Count	Count	5	4	9
		Expected Count	2.5	6.5	9.0
		% within Umur	55.6%	44.4%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	45.5%	13.8%	22.5%
		% of Total	12.5%	10.0%	22.5%
Total	Count	Count	11	29	40
		Expected Count	11.0	29.0	40.0
		% within Umur	27.5%	72.5%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	27.5%	72.5%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.121 <sup>a</sup>	2	.077
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	4.889	2	.087
Linear-by-Linear Association	1.598	1	.206
N of Valid Cases	40		

<sup>a</sup> 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.48.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.337			.077
Interval by Interval Pearson's R	-.202	.173	-1.274	.210 <sup>a</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.195	.178	-1.228	.227 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis.

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

<sup>c</sup> Based on normal approximation.

**Crosstabs: Uji Hubungan umur dengan Mutasi p53 ekson 7****Umur \* Mutasi P53 Ekson 7 Crosstabulation**

		Mutasi P53 Ekson 7		Total	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)		
Umur	40-50 th	Count	2	9	11
		Expected Count	6.1	5.0	11.0
		% within Umur	18.2%	81.8%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 7	9.1%	50.0%	27.5%
		% of Total	5.0%	22.5%	27.5%
51-60 th	Count	12	8	20	
	Expected Count	11.0	9.0	20.0	
	% within Umur	60.0%	40.0%	100.0%	
	% within Mutasi P53 Ekson 7	54.5%	44.4%	50.0%	
	% of Total	30.0%	20.0%	50.0%	
>60 th	Count	8	1	9	
	Expected Count	5.0	4.1	9.0	
	% within Umur	88.9%	11.1%	100.0%	
	% within Mutasi P53 Ekson 7	36.4%	5.6%	22.5%	
	% of Total	20.0%	2.5%	22.5%	
Total	Count	22	18	40	
	Expected Count	22.0	18.0	40.0	
	% within Umur	55.0%	45.0%	100.0%	
	% within Mutasi P53 Ekson 7	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	55.0%	45.0%	100.0%	

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.403 <sup>a</sup>	2	.006
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	11.421	2	.003
Linear-by-Linear Association	9.979	1	.002
N of Valid Cases	40		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.05.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>b</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.454			.006 <sup>c</sup>
Interval by Interval Pearson's R	-.506	.118	-3.615	.001 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.507	.119	-3.628	.001 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

**Crosstabs; Uji Hubungan Umur dengan mutasi p16****Umur \* Mutasi P16 Crosstabulation**

			Mutasi P16		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	Count	4	7	11
		Expected Count	3.9	7.2	11.1
		% within Umur	36.4%	63.6%	100.0%
		% within Mutasi P16	28.6%	26.9%	27.5%
		% of Total	10.0%	17.5%	27.5%
51-60 th	51-60 th	Count	7	13	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within Umur	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	50.0%	50.0%	50.0%
		% of Total	17.5%	32.5%	50.0%
>60 th	>60 th	Count	3	6	9
		Expected Count	3.2	5.9	9.1
		% within Umur	33.3%	66.7%	100.0%
		% within Mutasi P16	21.4%	23.1%	22.5%
		% of Total	7.5%	15.0%	22.5%
Total	Total	Count	14	26	40
		Expected Count	14.0	26.0	40.0
		% within Umur	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.020 <sup>a</sup>	2	.990
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	.020	2	.990
Linear-by-Linear Association	.019	1	.889
N of Valid Cases	40		

a. 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.15.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>b</sup>	Approx. T <sup>c</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.022			.990
Interval by Interval Pearson's R	.022	.158	.137	.891 <sup>a</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.022	.158	.137	.892 <sup>a</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

**Crosstabs; Uji Hubungan Umur dengan Mutasi p16 ekson 1****Umur \* Mutasi P16 Ekson 1 Crosstabulation**

			Mutasi P16 Ekson 1		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	Count	4	7	11
		Expected Count	3.9	7.2	11.0
		% within Umur	36.4%	63.6%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 1	28.6%	26.9%	27.5%
		% of Total	10.0%	17.5%	27.5%
	51-60 th	Count	7	13	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within Umur	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 1	50.0%	50.0%	50.0%
		% of Total	17.5%	32.5%	50.0%
	>60 th	Count	3	6	9
		Expected Count	3.2	5.9	9.0
		% within Umur	33.3%	66.7%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 1	21.4%	23.1%	22.5%
		% of Total	7.5%	15.0%	22.5%
Total		Count	14	26	40
		Expected Count	14.0	26.0	40.0
		% within Umur	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 1	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	.020 <sup>a</sup>	2	.990
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	.020	2	.990
Linear-by-Linear Association	.019	1	.889
N of Valid Cases	40		

<sup>a</sup> 2 cells (33.3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.15.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.022			.990
Interval by Interval Pearson's R	.022	.158	.137	.891 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.022	.158	.137	.892 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis.

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

<sup>c</sup> Based on normal approximation.

**Crosstabs: Uji Hubungan Umur dengan Mutasi p16 ekson 2****Umur \* Mutasi P16 Exon 2 Crosstabulation**

			Mutasi P16 Exon 2		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Umur	40-50 th	Count	4	7	11
		Expected Count	1.7	9.4	11.0
		% within Umur	36.4%	63.6%	100.0%
		% within Mutasi P16 Exon 2	66.7%	20.6%	27.5%
		% of Total	10.0%	17.5%	27.5%
	51-60 th	Count	2	18	20
		Expected Count	3.0	17.0	20.0
		% within Umur	10.0%	90.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Exon 2	33.3%	52.9%	50.0%
		% of Total	5.0%	45.0%	50.0%
	>60 th	Count	0	9	9
		Expected Count	1.4	7.7	9.0
		% within Umur	0%	100.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Exon 2	0%	26.5%	22.5%
		% of Total	0%	22.5%	22.5%
Total		Count	6	34	40
		Expected Count	6.0	34.0	40.0
		% within Umur	15.0%	85.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Exon 2	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	15.0%	85.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5.918 <sup>a</sup>	2	.052
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	6.393	2	.041
Linear-by-Linear Association	5.261	1	.022
N of Valid Cases	40		

a. 3 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.35.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. J <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.359			.052
Interval by Interval Pearson's R	.367	.119	2.434	.020 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.370	.122	2.454	.019 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.



**Crosstabs: Uji Hubungan Rokok/Ngunang dengan Mutasi p53****Rokok/Ngunang \* Mutasi P53 Crosstabulation**

		Mutasi P53		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Ngunang Ya	Count	23	5	28
	Expected Count	19.6	8.4	28.0
	% within Rokok/Ngunang	82.1%	17.9%	100.0%
	% within Mutasi P53	82.1%	41.7%	70.0%
	% of Total	57.5%	12.5%	70.0%
Tidak	Count	5	7	12
	Expected Count	8.4	3.6	12.0
	% within Rokok/Ngunang	41.7%	58.3%	100.0%
	% within Mutasi P53	17.9%	58.3%	30.0%
	% of Total	12.5%	17.5%	30.0%
Total	Count	28	12	40
	Expected Count	28.0	12.0	40.0
	% within Rokok/Ngunang	70.0%	30.0%	100.0%
	% within Mutasi P53	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	70.0%	30.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.553 <sup>a</sup>	1	.010		
Continuity Correction <sup>b</sup>	4.768	1	.029		
Likelihood Ratio	6.292	1	.012		
Fisher's Exact Test				.021	.016
Linear-by-Linear Association	6.389	1	.011		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 3 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.60

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.375			.010 <sup>c</sup>
Interval by Interval Pearson's R	.405	.157	2.729	.010 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.405	.157	2.729	.010 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs; Uji Hubungan Rokok/Nginnang dengan mutasi p53 ekson 5****Rokok/Nginnang \* Mutasi P53 Exon 5 Crosstabulation**

		Mutasi P53 Exon 5		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Nginnang Ya	Count	9	19	28
	Expected Count	7.7	20.3	28.0
	% within Rokok/Nginnang	32.1%	67.9%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	81.8%	65.5%	70.0%
	% of Total	22.5%	47.5%	70.0%
Tidak	Count	2	10	12
	Expected Count	3.3	8.7	12.0
	% within Rokok/Nginnang	16.7%	83.3%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	18.2%	34.5%	30.0%
	% of Total	5.0%	25.0%	30.0%
Total	Count	11	29	40
	Expected Count	11.0	29.0	40.0
	% within Rokok/Nginnang	27.5%	72.5%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	27.5%	72.5%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.009 <sup>a</sup>	1	.315		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.382	1	.536		
Likelihood Ratio	1.075	1	.300		
Fisher's Exact Test				.451	.275
Linear-by-Linear Association	.984	1	.321		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.30.

**Symmetric Measures**

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Contingency Coefficient	.157			.315
Interval by Interval	Pearson's R	.159	.141	.992	.328 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.159	.141	.992	.328 <sup>c</sup>
N of Valid Cases		40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs: Uji Hubungan Rokok/Nginang dengan mutasi p53 ekson 7****Rokok/Nginang \* Mutasi P53 Ekson 7 Crosstabulation**

		Mutasi P53 Ekson 7		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Nginang Ya	Count	19	9	28
	Expected Count	15.4	12.6	28.0
	% within Rokok/Nginang	67.9%	32.1%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	86.4%	50.0%	70.0%
	% of Total	47.5%	22.5%	70.0%
Tidak	Count	3	9	12
	Expected Count	6.6	5.4	12.0
	% within Rokok/Nginang	25.0%	75.0%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	13.6%	50.0%	30.0%
	% of Total	7.5%	22.5%	30.0%
Total	Count	22	18	40
	Expected Count	22.0	18.0	40.0
	% within Rokok/Nginang	55.0%	45.0%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	55.0%	45.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.234 <sup>a</sup>	1	.013		
Continuity Correction <sup>c</sup>	4.622	1	.032		
Likelihood Ratio	6.390	1	.011		
Fisher's Exact Test				.018	.015
Linear-by-Linear Association	6.078	1	.014		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.40

**Symmetric Measures**

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Coefficient	.367			.013
Interval by Interval	Pearson's R	.395	.144	2.649	.012 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal	Spearman Correlation	.395	.144	2.649	.012 <sup>c</sup>
N of Valid Cases		40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs; Uji Hubungan Rokok/Nguing dengan Mutasi p16****Rokok/Nguing \* Mutasi P16 Crosstabulation**

		Mutasi P16		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Nguing Ya	Count	12	16	28
	Expected Count	9.8	18.2	28.0
	% within Rokok/Nguing	42.9%	57.1%	100.0%
	% within Mutasi P16	85.7%	61.5%	70.0%
	% of Total	30.0%	40.0%	70.0%
Tidak	Count	2	10	12
	Expected Count	4.2	7.8	12.0
	% within Rokok/Nguing	16.7%	83.3%	100.0%
	% within Mutasi P16	14.3%	38.5%	30.0%
	% of Total	5.0%	25.0%	30.0%
Total	Count	14	26	40
	Expected Count	14.0	26.0	40.0
	% within Rokok/Nguing	35.0%	65.0%	100.0%
	% within Mutasi P16	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.533 <sup>a</sup>	1	.112		
Continuity Correction <sup>b</sup>	1.512	1	.219		
Likelihood Ratio	2.739	1	.098		
Fisher's Exact Test				.157	.108
Linear-by-Linear Association	2.469	1	.116		
N of Valid Cases	40				

<sup>a</sup> Computed only for a 2x2 table

<sup>b</sup> 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.20

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Conguency Coefficient	.344			.112
Interval by Interval Pearson's R	.252	.136	1.403	.117 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.252	.136	1.603	.117 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

<sup>c</sup> Based on normal approximation

**Crosstabs; Uji Hubungan Rokok /Nginang dengan Mutasi p16 ekson 1****Rokok/Nginang \* Mutasi P16 Ekson 1 Crosstabulation**

		Mutasi P16 Ekson 1		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Nginang Ya	Count	12	16	28
	Expected Count	9.8	18.2	28.0
	% within Rokok/Nginang	42.9%	57.1%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 1	85.7%	61.5%	70.0%
	% of Total	30.0%	40.0%	70.0%
Tidak	Count	2	10	12
	Expected Count	4.2	7.8	12.0
	% within Rokok/Nginang	16.7%	83.3%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 1	14.3%	38.5%	30.0%
	% of Total	5.0%	25.0%	30.0%
Total	Count	14	26	40
	Expected Count	14.0	26.0	40.0
	% within Rokok/Nginang	35.0%	65.0%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 1	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2.533 <sup>a</sup>	1	.112		
Continuity Correction <sup>b</sup>	1.512	1	.219		
Likelihood Ratio	2.739	1	.098		
Fisher's Exact Test				.157	.108
Linear-by-Linear Association	2.469	1	.116		
N of Valid Cases	40				

<sup>a</sup> Computed only for a 2x2 table

<sup>b</sup> 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.20

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.244			.112
Interval by Interval Pearson's R	.252	.136	1.603	.117 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.252	.136	1.603	.117 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

<sup>c</sup> Based on normal approximation



**Crosstabs: Uji Hubungan Rokok /Nginang dengan Mutasi p16 ekson 2****Rokok/Nginang \* Mutasi P16 Ekson 2 Crosstabulation**

		Mutasi P16 Ekson 2		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Rokok/Nginang Ya	Count	6	22	28
	Expected Count	4.2	23.8	28.0
	% within Rokok/Nginang	21.4%	78.6%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	100.0%	64.7%	70.0%
	% of Total	15.0%	55.0%	70.0%
Tidak	Count	0	12	12
	Expected Count	1.8	10.2	12.0
	% within Rokok/Nginang	0%	100.0%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	0%	35.3%	30.0%
	% of Total	0%	30.0%	30.0%
Total	Count	6	34	40
	Expected Count	6.0	34.0	40.0
	% within Rokok/Nginang	15.0%	85.0%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	15.0%	85.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.025 <sup>a</sup>	1	.082		
Continuity Correction <sup>b</sup>	1.578	1	.209		
Likelihood Ratio	4.720	1	.030		
Fisher's Exact Test				.153	.098
Linear-by-Linear Association	2.950	1	.086		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.80.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.265			.082
Interval by Interval Pearson's R	.275	.066	1.763	.086 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	.275	.066	1.763	.086 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs; Uji Hubungan Stadium Klinis dengan Mutasi p53****Stadium klinis \* Mutasi P53 Crosstabulation**

		Mutasi P53		Total
		Mutasi (-)	Tdk Mutasi (-)	
Stadium klinis I & II	Count	6	8	14
	Expected Count	9.8	4.2	14.0
	% within Stadium klinis	42.9%	57.1%	100.0%
	% within Mutasi P53	21.4%	66.7%	35.0%
	% of Total	15.0%	20.0%	35.0%
III & IV	Count	22	4	26
	Expected Count	18.2	7.8	26.0
	% within Stadium klinis	84.6%	15.4%	100.0%
	% within Mutasi P53	78.6%	33.3%	65.0%
	% of Total	55.0%	10.0%	65.0%
Total	Count	28	12	40
	Expected Count	28.0	12.0	40.0
	% within Stadium klinis	70.0%	30.0%	100.0%
	% within Mutasi P53	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	70.0%	30.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7.556 <sup>a</sup>	1	.006		
Continuity Correction	5.699	1	.017		
Likelihood Ratio	7.423	1	.006		
Fisher's Exact Test				.011	.009
Linear-by-Linear Association	7.367	1	.007		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.20

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. $T^b$	Approx. Sig.
Normal by Normal Contingency Coefficient	.399			.006
Interval by Interval Pearson's R	-.435	.151	-2.975	.005 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.435	.151	-2.975	.005 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation

**Crosstabs: Uji Hubungan Stadium Klinis dengan Mutasi p53 ekson 5****Stadium klinis \* Mutasi P53 Exon 5 Crosstabulation**

		Mutasi P53 Exon 5		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Stadium I & II klimas	Count	2	12	14
	Expected Count	3.9	10.1	14.0
	% within Stadium klinis	14.3%	85.7%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	18.2%	41.4%	35.0%
	% of Total	5.0%	30.0%	35.0%
III & IV	Count	9	17	26
	Expected Count	7.2	18.9	26.0
	% within Stadium klinis	34.6%	65.4%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	81.8%	58.6%	65.0%
	% of Total	22.5%	42.5%	65.0%
Total	Count	11	29	40
	Expected Count	11.0	29.0	40.0
	% within Stadium klinis	27.5%	72.5%	100.0%
	% within Mutasi P53 Exon 5	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	27.5%	72.5%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.886 <sup>a</sup>	1	.170		
Continuity Correction <sup>b</sup>	1.005	1	.316		
Likelihood Ratio	2.029	1	.154		
Fisher's Exact Test				.270	.159
Linear-by-Linear Association	1.839	1	.175		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.85

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.212			.170
Interval by Interval Pearson's R	-.217	.138	-1.371	.178 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.217	.138	-1.371	.178 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs: Uji Hubungan Stadium Klinis dengan Mutasi p53 ekson 7****Stadium klinis \* Mutasi P53 Ekson 7 Crosstabulation**

		Mutasi P53 Ekson 7		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Stadium I & II klinis	Count	4	10	14
	Expected Count	7.7	6.3	14.0
	% within Stadium klinis	28.6%	71.4%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	18.2%	55.6%	35.0%
	% of Total	10.0%	25.0%	35.0%
III & IV	Count	18	8	26
	Expected Count	14.3	11.7	26.0
	% within Stadium klinis	69.2%	30.8%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	81.8%	44.4%	65.0%
	% of Total	45.0%	20.0%	65.0%
Total	Count	22	18	40
	Expected Count	22.0	18.0	40.0
	% within Stadium klinis	55.0%	45.0%	100.0%
	% within Mutasi P53 Ekson 7	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	55.0%	45.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig (2-sided)	Exact Sig (2-sided)	Exact Sig (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.078 <sup>a</sup>	1	.014		
Continuity Correction <sup>b</sup>	4.547	1	.033		
Likelihood Ratio	6.203	1	.013		
Fisher's Exact Test				.021	.016
Linear-by-Linear Association	5.926	1	.015		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.30

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.363			.014
Ordinal by Ordinal Pearson's R	-.390	.146	-2.609	.013 <sup>b</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.390	.146	-2.609	.013 <sup>b</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

**Crosstabs: Uji Hubungan Stadium Klinis dengan Mutasi p16****Stadium klinis \* Mutasi P16 Crosstabulation**

		Mutasi P16		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Stadium klinis I & II	Count	4	10	14
	Expected Count	4.9	9.1	14.0
	% within Stadium klinis	28.6%	71.4%	100.0%
	% within Mutasi P16	28.6%	38.5%	35.0%
	% of Total	10.0%	25.0%	35.0%
III & IV	Count	10	16	26
	Expected Count	9.1	16.9	26.0
	% within Stadium klinis	38.5%	61.5%	100.0%
	% within Mutasi P16	71.4%	61.5%	65.0%
	% of Total	25.0%	40.0%	65.0%
Total	Count	14	26	40
	Expected Count	14.0	26.0	40.0
	% within Stadium klinis	35.0%	65.0%	100.0%
	% within Mutasi P16	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.391 <sup>b</sup>	1	.532		
Continuity Correction <sup>a</sup>	.077	1	.781		
Likelihood Ratio	.398	1	.528		
Fisher's Exact Test				.730	.395
Linear-by-Linear Association	.381	1	.537		
N of Valid Cases	40				

<sup>a</sup> Computed only for a 2x2 table

<sup>b</sup> 1 cells (25.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.90

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig. <sup>c</sup>
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.098			.532
Interval by Interval Pearson's R	-.099	.154	-.643	.544 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.099	.154	-.643	.544 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

<sup>c</sup> Based on normal approximation



**Crosstabs: Uji Hubungan Stadium KJinis dengan Mutasi p16 ekson1****Sistem TNM (Noduli) \* Mutasi P16 Exon 1 Crosstabulation**

		Mutasi P16 Exon 1		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Sistem TNM No (Noduli)	Count	4	10	14
	Expected Count	4.9	9.1	14.0
	% within Sistem TNM (Noduli)	28.6%	71.4%	100.0%
	% within Mutasi P16 Exon 1	28.6%	38.5%	35.0%
	% of Total	10.0%	25.0%	35.0%
N+	Count	10	16	26
	Expected Count	9.1	16.9	26.0
	% within Sistem TNM (Noduli)	38.5%	61.5%	100.0%
	% within Mutasi P16 Exon 1	71.4%	61.5%	65.0%
	% of Total	25.0%	40.0%	65.0%
Total	Count	14	26	40
	Expected Count	14.0	26.0	40.0
	% within Sistem TNM (Noduli)	55.0%	65.0%	100.0%
	% within Mutasi P16 Exon 1	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.391 <sup>a</sup>	1	.532		
Continuity Correction <sup>b</sup>	.077	1	.781		
Likelihood Ratio	.398	1	.528		
Fisher's Exact Test				.730	.395
Linear-by-Linear Association	.381	1	.537		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 1 cells (.25 0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4.90.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. Z <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.098			.532
Interval by Interval Pearson's R	-.099	.154	-.613	.544 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.099	.154	-.613	.544 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

c. Based on normal approximation.

**Crosstabs; Uji Hubungan Stadium Klinis dengan Mutasi p16 ekson 2****Stadium klinis \* Mutasi P16 Ekson 2 Crosstabulation**

		Mutasi P16 Ekson 2		Total
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
Stadium klinis I & II	Count	2	12	14
	Expected Count	2.1	11.9	14.0
	% within Stadium klinis	14.3%	85.7%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	33.3%	35.3%	35.0%
	% of Total	5.0%	30.0%	35.0%
III & IV	Count	4	22	26
	Expected Count	3.9	22.1	26.0
	% within Stadium klinis	15.4%	84.6%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	66.7%	64.7%	65.0%
	% of Total	10.0%	55.0%	65.0%
Total	Count	6	34	40
	Expected Count	6.0	34.0	40.0
	% within Stadium klinis	15.0%	85.0%	100.0%
	% within Mutasi P16 Ekson 2	100.0%	100.0%	100.0%
	% of Total	15.0%	85.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.003 <sup>a</sup>	1	.926		
Continuity Correction	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.003	1	.926		
Fisher's Exact Test				1.000	.654
Linear-by-Linear Association	.003	1	.927		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (.500%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.10.

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. †	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.015			.926
Interval by Interval Pearson's R	-.015	.157	-.090	.928 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.015	.157	-.090	.928 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Crosstabs: Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p53

HPA \* Mutasi P53 Crosstabulation

			Mutasi P53		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
HPA	Diferensiasi Baik	Count	12	8	20
		Expected Count	14.0	6.0	20.0
		% within HPA	60.0%	40.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	42.9%	66.7%	50.0%
		% of Total	30.0%	20.0%	50.0%
	Diferensiasi Jelek	Count	16	4	20
		Expected Count	14.0	6.0	20.0
		% within HPA	80.0%	20.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	57.1%	33.3%	50.0%
		% of Total	40.0%	10.0%	50.0%
Total		Count	28	12	40
		Expected Count	28.0	12.0	40.0
		% within HPA	70.0%	30.0%	100.0%
		% within Mutasi P53	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	70.0%	30.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1.905 <sup>a</sup>	1	.168		
Continuity Correction	1.071	1	.301		
Likelihood Ratio	1.933	1	.164		
Fisher's Exact Test				.301	.150
Linear-by-Linear Association	1.857	1	.173		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6.00

Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.213			.168
Interval by Interval Pearson's R	-.218	.152	-1.378	.176 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.218	.152	-1.378	.176 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Crosstabs; Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p53 Ekson 5

HPA \* Mutasi P53 Ekson 5 Crosstabulation

		Mutasi P53 Ekson 5		Total	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)		
HPA	Diferensiasi Baik	Count	2	18	20
		Expected Count	5.5	14.5	20.0
		% within HPA	10.0%	90.0%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	18.2%	62.1%	50.0%
		% of Total	5.0%	45.0%	50.0%
Diferensiasi Jelek	Count	Count	9	11	20
		Expected Count	5.5	14.5	20.0
		% within HPA	45.0%	55.0%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	81.8%	37.9%	50.0%
		% of Total	22.5%	27.5%	50.0%
Total	Count	Count	11	29	40
		Expected Count	11.0	29.0	40.0
		% within HPA	27.5%	72.5%	100.0%
		% within Mutasi P53 Ekson 5	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	27.5%	72.5%	100.0%

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6.144 <sup>b</sup>	1	.013		
Continuity Correction	4.514	1	.034		
Likelihood Ratio	6.525	1	.011		
Fisher's Exact Test				.031	.015
Linear-by-Linear Association	5.991	1	.014		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5.50

#### Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.365			.013
Ordinal by Ordinal Pearson's R	-.392	.135	-2.626	.012 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.392	.135	-2.626	.012 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Crosstabs: Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p53 ekson 7

HPA \* Mutasi P53 Exon 7 Crosstabulation

		Mutasi P53 Exon 7		Total	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)		
HPA	Diferensiasi Baik	Count	10	10	20
		Expected Count	11.0	9.0	20.0
		% within HPA	50.0%	50.0%	100.0%
		% within Mutasi P53 Exon	45.5%	55.6%	50.0%
		% of Total	25.0%	25.0%	50.0%
	Diferensiasi Jelek	Count	12	8	20
		Expected Count	11.0	9.0	20.0
		% within HPA	60.0%	40.0%	100.0%
		% within Mutasi P53 Exon	54.5%	44.4%	50.0%
		% of Total	30.0%	20.0%	50.0%
Total	Count	22	18	40	
	Expected Count	22.0	18.0	40.0	
	% within HPA	55.0%	45.0%	100.0%	
	% within Mutasi P53 Exon	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	55.0%	45.0%	100.0%	

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	404 <sup>a</sup>	1	.525		
Continuity Correction	.101	1	.751		
Likelihood Ratio	405	1	.525		
Fisher's Exact Test				.751	.376
Linear-by-Linear Association	.394	1	.530		
N of Valid Cases	40				

<sup>a</sup> Computed only for a 2x2 table

<sup>b</sup> 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9.00

#### Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.100			.525
Interval by Interval Pearson's R	-.101	.157	-.623	.537 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.101	.157	-.623	.537 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

<sup>a</sup> Not assuming the null hypothesis

<sup>b</sup> Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

<sup>c</sup> Based on normal approximation



**Crosstabs; Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p16**

**HPA \* Mutasi P16 Crosstabulation**

			Mutasi P16		Total
			Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)	
HPA	Diferensiasi Baik	Count	4	16	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within HPA	20.0%	80.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	28.6%	61.5%	50.0%
		% of Total	10.0%	40.0%	50.0%
Diferensiasi Jelek	Count	Count	10	10	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within HPA	50.0%	50.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	71.4%	38.5%	50.0%
		% of Total	25.0%	25.0%	50.0%
Total	Count	Count	14	26	40
		Expected Count	14.0	26.0	40.0
		% within HPA	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.956 <sup>a</sup>	1	.047		
Continuity Correction <sup>b</sup>	2.747	1	.097		
Likelihood Ratio	4.054	1	.044		
Fisher's Exact Test				.096	.048
Linear-by-Linear Association	3.857	1	.050		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.00

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.300			.047
Interval by Interval Pearson's R	-.314	.148	-2.042	.048 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.314	.148	-2.042	.048 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Crosstabs: Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p16 Ekson 1

HPA \* Mutasi P16 Ekson 1 Crosstabulation

		Mutasi P16 Ekson 1		Total	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)		
HPA	Diferensiasi Baik	Count	4	16	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within HPA	20.0%	80.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson	28.6%	61.5%	50.0%
		% of Total	10.0%	40.0%	50.0%
Diferensiasi Jelek	Count	Count	11	10	20
		Expected Count	7.0	13.0	20.0
		% within HPA	50.0%	50.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson	71.4%	38.5%	50.0%
		% of Total	25.0%	25.0%	50.0%
Total	Count	Count	14	26	40
		Expected Count	14.0	26.0	40.0
		% within HPA	35.0%	65.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson	100.0%	100.0%	100.0%
		% of Total	35.0%	65.0%	100.0%

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3.956 <sup>a</sup>	1	.047		
Continuity Correction	2.747	1	.097		
Likelihood Ratio	4.054	1	.044		
Fisher's Exact Test				.076	.048
Linear-by-Linear Association	3.857	1	.050		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7.00

#### Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.300			.047
Interval by Interval Pearson's R	-.314	.148	-2.042	.048 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.314	.148	-2.042	.048 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation

### Crosstabs: Uji Hubungan HPA ( Diferensiasi baik dan Jelek ) dengan Mutasi p16 Ekson 2

HPA \* Mutasi P16 Ekson 2 Crosstabulation

		Mutasi P16 Ekson 2		Total	
		Mutasi (+)	Tdk Mutasi (-)		
HPA	Diferensiasi Baik	Count	2	18	20
		Expected Count	3.0	17.0	20.0
		% within HPA	10.0%	90.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 2	33.3%	52.9%	50.0%
		% of Total	5.0%	45.0%	50.0%
	Diferensiasi Jelek	Count	4	16	20
		Expected Count	3.0	17.0	20.0
		% within HPA	20.0%	80.0%	100.0%
		% within Mutasi P16 Ekson 2	66.7%	47.1%	50.0%
		% of Total	10.0%	40.0%	50.0%
Total	Count	6	34	40	
	Expected Count	6.0	34.0	40.0	
	% within HPA	15.0%	85.0%	100.0%	
	% within Mutasi P16 Ekson 2	100.0%	100.0%	100.0%	
	% of Total	15.0%	85.0%	100.0%	

#### Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.784 <sup>b</sup>	1	.376		
Continuity Correction	.196	1	.658		
Likelihood Ratio	.797	1	.372		
Fisher's Exact Test				.661	.331
Linear-by-Linear Association	.765	1	.382		
N of Valid Cases	40				

a. Computed only for a 2x2 table

b. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3.00

#### Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. J <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Nominal by Nominal Contingency Coefficient	.139			.376
Interval by Interval Pearson's R	-.140	.152	-.872	.389 <sup>c</sup>
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	-.140	.152	-.872	.389 <sup>c</sup>
N of Valid Cases	40			

a. Not assuming the null hypothesis

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

c. Based on normal approximation