

DISERTASI

KARSINOGENESIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BERDASAR EKSPRESI P53, c-myc DAN bcl-2

(PENDEKATAN PATOBIOLOGI MOLEKULER)



THERESIA INDAH BUDHY S.

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**



**KARSINOGENESIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA
RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI
EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BERDASAR EKSPRESI
P53, c-myc DAN bcl-2
(PENDEKATAN PATOBIOLOGI MOLEKULER)**

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 : 18 Mei 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB



Oleh :

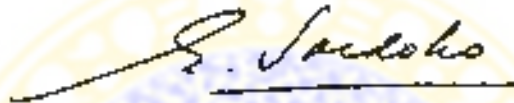
THERESIA INDAH BUDHY S.
NIM. 090013729 D

LEMBAR PENGESAHAN

**Naskah ini telah diperiksa dan disetujui
Pada tanggal 7 Juni 2004**

Oleh:

Promotor:



Prof. Dr. Roem Werdiniadi Soedoko, dr, Sp.PA

Ko-Promotor I



Prof. Dr. Sofia Mubanka, M.Med.Sc, Ph.D

Ko-Promotor II



Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS.

Telah diuji pada

Tanggal 24 Maret 2004

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof Soetjipto, dr, MS, PhD

Anggota : 1. Prof Dr Roem Werdiniadi Soedoko, dr, SpPA
2. Prof Sofia Mubarika, dr, MMedSc, PhD
3. Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS.
4. Prof Kuntoro, dr, MPH, Dr PH
5. Prof Retno Laksmningsih, drg, MHPed
6. Prof Soegeng Soekanto, dr, SpPA, PhD
7. Dr Med, Indwiani Astuti, dr

Sesuai Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor: 2492/J03/PP/2004
Tanggal: 31 Maret 2004

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala limpahan taufik dan hidayahNya sehingga saya mendapatkan petunjuk dan kemampuan untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini

Pada kesempatan ini perkenankan saya menyampaikan rasa hormat dan tenma kasih yang setulusnya kepada yang terhormat

Prof Dr Roemwerdiniadi Soedoko, dr, Sp PA, atas kesediaan beliau menjadi Promotor, di tengah kesibukan beliau yang begitu padat masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan petunjuk dengan penuh kesabaran Sebagai seorang pembimbing yang sarat dengan tugas, beliau selalu memberikan dorongan dan dukungan moral dan kelemahlembutannya memberikan kedamaian dan ketenangan tersendiri dalam penyelesaian disertasi ini

Prof Sofia Mubarika, dr, MMed Sci, PhD, atas kesediaan beliau menjadi kopromotor walaupun tugas beliau sangat sarat dan padat namun masih berkenan memberi bimbingan, dengan penuh ketelatenan, kesabaran mendidik dan memotivasi agar peserta didik pantang menyerah dalam melakukan penelitian sehingga dapat berhasil dengan baik.

Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS, atas kesediaan beliau menjadi kopromotor, sejak awal selalu memberikan bimbingan dan tidak bosan memberikan saran dalam menumbuhkan alur pikir seorang ilmuwan dalam penulisan disertasi. Sebagai seorang pendidik yang sangat sibuk, beliau tetap mempunyai komitmen dan tanggung jawab yang kuat terhadap keberhasilan studi semua peserta didik dan bimbingannya.

Saya bersyukur sekali dan bahagia ketiga beliau berkenan menjadi promotor dan kopromotor yang penuh tanggung jawab dan tulis hati, sehingga saya berhasil menyelesaikan disertasi ini. Semoga budi baik dan ketulusan hati selama membimbing serta mendidik saya, beliau bertiga mendapatkan limpahan Rahmat dan Karunia dari Tuhan Yang Maha Esa.

Pemerintah Republik Indonesia, khususnya Menteri Pendidikan Nasional dan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program pendidikan doktor

Rektor Universitas Airlangga, Prof Dr Med Puruhito, dr. SpBJP dan mantan Rektor Prof H Soedarto, dr. DTM&H, PhD, yang telah menerima dan memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr H Muhammad Amin, dr Sp P (K) dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof Dr H Soedijono Tirtowidardjo, dr. Sp THT (K), yang telah menerima dan memberi kesempatan mengikuti program pendidikan doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Prof Dr Juliati Hood Alsagaff, dr, MS, Sp PA, FIAC, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran S3 Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah melaksanakan tugas untuk kelancaran proses pendidikan dan ujian

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof Dr Moh Rubianto drg, MS, Sp Perio dan mantan Dekan FKG Unair, Dr Boediardjo, drg, MSc yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk mengikuti program pendidikan doktor.

Para Dosen pemberi Mata Kuliah Penunjang Disertasi (MKPD) Prof Suljpto, dr, MS, PhD, Dr Fedik A Rantam, drh, Dr I Ketut Suidiana, Drs, MSc, yang telah memberi banyak asupan pemikiran penyusunan kerangka ilmiah dalam disertasi ini

Para Pembimbing dan Penguji mulai ujian kualifikasi, ujian proposal: Prof Dr Roem Soedoko, dr SpPA; Prof Sofia Mubanka, dr, MMed Sci, PhD; Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS; Prof Retno L Soebagyo, drg, MPHed; Dr Ketut Muliarta, dr Sp PA; Dr Fedik A. Rantam, drh, Prof Kuntoro dr, MPH, Dr PH; Prof Dr Moetmainah Prajitno, drg, Sp KG, atas dukungan dan asupan dalam pemikiran dan penulisan disertasi ini

Saya ucapkan terima kasih kepada dosen saya Prof H Eddy Pranowo Soedibjo, dr, MPH (Almarhum), semoga semua jasa beliau diterima oleh Tuhan sebagai amal ibadah. Saya ucapkan terima kasih dan penghargaan kepada para dosen saya: Prof Soetandyo, MPA, Prof Dr J. Glinka, SVD, Prof Dr Koento Wibisono Suswomihardjo, Prof Dr Pitono Soeparto, dr, SpAK, Prof Dr Suhartono Taat Putra, dr, MS, Prof Dr Muhammad Zainuddin, Apt, Dr L Dyson P, MA, Fuad Amsyari, dr, MPH, PhD, Siti Panani, dr, MS, MPH, PhD, Widodo J Pudjirahardjo, dr, MS, MPH, Dr PH, Prof H. Bambang Rahino S., dr, Prof Poemomo Suryohudoyo, dr.

Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya Slamet Riyadi Yuwono dr, DTM&H, MARS dan mantan direktur RSUD Dr. Soetomo Prof H.M. Dikman Angsor, dr. SpOG, KFM.

Kepala Instalasi Bedah Kepala dan Leher RSUD Dr. Soetomo. Sunarto Reksoprawiro, dr SpBKL-onk; dan juga Yoga Wijayahadi, dr SpB yang banyak membantu dalam pengumpulan sampel penderita kanker rongga mulut, dengan ijin dan bantuan beliau maka penelitian bisa terlaksana dengan baik. Tak lupa kepada Dr. Widodo Ario Kencono, dr SpTHT yang banyak memberi asupan referensi sehingga tersusun kerangka ilmiah.

Prof Kuntoro, dr, MPH, Dr PH dan Abdul Khoik, AMS yang banyak membantu dan memberikan konsultasi metodologi penelitian dan analisis statistik sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dan dilaporkan.

Para penderita yang dengan sadar telah menyatakan persetujuan untuk berperan serta pada penelitian ini Tanpa kesediaan mereka tentu penelitian ini tidak terlaksana.

Perkenankan pada kesempatan ini saya juga menyampaikan rasa terima kasih kepada:

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada: Prof Dr Hardiyanto Subono, dr, SpKK dan Kepala Bagian Histologi dan Biologi Sel, Prof Marsetyawan, dr, MSc, PhD yang telah memben ijin untuk mengerjakan penelitian ini sehingga dapat diselesaikan.

Kepala Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr Sardjito: Dr Harijadi, dr, SpPA yang memberi ijin dan membantu menyelesaikan serta memeriksa hasil penelitian ini, tanpa bantuan beliau tentu disertasi tidak akan selesai, juga mbak Agustin yang banyak membantu menyelesaikan penelitian ini.

Kepala Bagian Patologi Anatomi FK Universitas Airlangga: Prof Sugeng Soekanto, dr, Sp PA, PhD dan penanggung jawab Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo, Kusumowardojo, dr, MS, Sp PA, serta rekan sejawat Dyah Fauziah, dr yang banyak membantu memeriksa sediaan hasil penelitian, juga Pak Eko, Pak Pajo, Mbak Yuni yang banyak membantu sehingga semua pemeriksaan tersebut dapat terselesaikan.

Dr. Aulann'am, drh, DES, yang telah memberi ijin dan membantu pelaksanaan penelitian di Lab Molekuler Fakultas MIPA Unibraw, juga Mbak Levy dan Wulan yang telah banyak membantu.

Rekan sejawat Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Unair: Dr Istiati, drg, SU, Diana Nurwati, drg, MS; Edhi Jularso, drg, MS; Bambang Sumaryono, drg, MKes; Retno Puji Rahayu, drg, MKes. atas pengertian dan kerjasamanya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Kepala *Tropical Disease Center* (TDC) Unair, Prof. Yoes Priyatna Dahlan, dr, MS, PhD. yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian di TDC. Prof Dr Indrayana, dr, SpPF (AIm) yang banyak membantu dan mendukung pelaksanaan penelitian.

Para teman sejawat sesama mahasiswa S3 Program Pascasarjana angkatan tahun 2000, baik yang dari Surabaya maupun dari tempat lain: Dr Mardji, Drs, MKes. Dr. Aulanni'am, drh, DES; Dr Gempur Santoso, Drs, MKes; Sugiarto, Drs, MS; Dr Anwar Maruf, drh, MKes; C.A. Nidom, drh, MS; Indah Listiani Kсандani, drg, MKes; Pudji Srianto, drh, MKes; Dr Teddy Ontoseno, dr, SpJP, SpAK; Achmad Syarwani, dr, SpB, SpBO; Hudi Winarso, dr, MKes, SpAnd; Hadi Ismono, dr, MKes; Muhammad Saiful Islam, dr, SpS; Ikeu Ekayanti, Ir, MKes; Dr Sn Wahyuningsih, Ir, Msi, Moh. Hasan Machfoed, dr, MS SpS(K); Slamet Riadi, drh, Msi; Retno Puji Rahayu, drg, MKes; Djelita Rickum, SKM, MKes; Dr Ariyanta Harsono, dr, SpA(K), Doti Wahyuningsih, dr, MKes; Sulistiana Prabowo, dr, MS; Dr Minsya T Djating, Drs, MKes; Dr Sri Sulistyoni, Dra, MPd; dan Didik Budijanto, drh, MKes; atas kerja sama dalam menempuh pendidikan serta saling mendukung memberikan semangat. Tak lupa saya ucapkan pada teman sejawat mahasiswa S3 Angkatan Tahun 2001: Hani Plumeniastuti, drh, MKes; IGA Wahyuni Ardhani, drg, MKes; Lucia Trisuwanti, drh, SU; Diah Savitri, drg, MKes; Yenny Sunaryani, drg, MKes; Hasdiana, drh, MKes; Helmi Mustofa E., drh, MKes; I Ketut Meles, drh, MKes.

Kepala Bagian Biologi Mulut FKG Unair, Markus Budi Raharjo, drg, MKes dan semua teman sejawat di Bagian Biologi Mulut, atas dukungan, pengertian dan dorongan semangatnya.

Semua rekan di GRAMIK Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu saya dalam mendapatkan informasi melalui internet dan penyusunan disertasi: Ir. Slamet Soeharto, Sri Mustama, Dra, MKes; Atika, S.Si, M.Si, Nuning, Amd; Leny, Amd; Bayu, Amd dan Endah Kusumawardhani, S.Kom; Rini Astutik, Gondo Mastutik, drh, MKes; Suwondo dan Martono.

Semua rekan di GBPT RSUD Dr Soetomo; rekan di TDC Unair mbak Indah dan Pak Chusen; Mbak Didin dan Sri Budi di Instalasi Bedah Kepala Leher yang banyak membantu kelancaran penelitian.

Kepala Bagian Ilmu Hayati UGM Dr Sismandari, Dra Apt dan rekan-rekan di Bagian Ilmu Hayati, mbak Atin, mbak Yuni atas bantuan melakukan penelitian ini

Semua rekan di Lab Biologi Molekuler dan Histologi UGM, mbak Dewi, mbak Jajah dan mbak Neny yang turut membantu penelitian dan memberi dorongan semangat

Prof Jaap Middeldorp, dari VU Amsterdam dan Prof Dr. Med Sc Li-Fu Hu, PhD dari Microbiology and Tumor Biology Center Karolinska Institute, yang telah banyak memberi arahan dan asupan sehingga saya dapat menyelesaikan penulisan disertasi ini.

Ibu Soewarni DS, drg, mantan Kepala Bagian Patologi Anatomi FKG, beliau banyak memberi motivasi dan dorongan sejak awal saya menjadi dosen di FKG Unair sampai saya menempuh pendidikan Doktor

Saudara Eman dan mbak Yuni yang telah ikut membantu menyelesaikan penulisan disertasi ini.

Rekan sejawat di FKG Unair yang turut memberi doa dan semangat sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi: Dr. Soetopo, drg; Roberto Simanjuntak, drg, SpBM; Dr Trijoedani W., drg, SpKG; Dr Istiati, drg, SU; Diana Nurwati, drg, MS; Dr Latief Mooduto, drg, MS; Isidora Karsini, drg, MS, SpPM.

Teman terkasih pengurus di lingkungan Yohanes Paroki Gembala Yang Baik di Surabaya yang telah mendoakan secara terus menerus sehingga saya menjadi lebih tenang dan pasrah.

Rekan di PPS Unair, mbak Siswati, pak Kumaidi, mbak Diah, pak Yanto dan semua kawan yang telah membantu proses kelancaran selama saya menempuh studi.

Semua pihak yang belum disebutkan di atas, yang telah membantu saya dalam menyelesaikan pendidikan, penelitian, dan penulisan disertasi

Akhirnya pada kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang kepada:

Kedua orang tua saya, Bapak R. Boedhijan Sri Warsitohadi (almarhum) dan Ibu Soejati Boedhijan (almarhumah), atas segala bimbingan dan doa restu serta didikan yang tidak pernah saya peroleh di pendidikan formal mulai saya dilahirkan, sehingga saya

capat menyelesaikan pendidikan program doktor. Semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu melimpahkan kasih sayang kepada kedua orang tua saya sebagaimana beliau berdua telah memberikan kasih sayang dalam membesarkan dan mendidik saya. Saya selalu mendoakan semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu mengampuni segala dosa, menerima semua amal ibadah dan arwah beliau di sisiNya

Kedua mertua saya, Bapak FX Suharsono (almarhum) dan Ibu Titik Sumardiyah, yang telah memberikan doa restu kepada saya sekeluarga. Semoga bapak mertua diampuni segala dosa, serta diterima semua amal ibadah dan arwah beliau di sisiNya. Kepada ibu mertua atas kesabaran dan doa restu beliau serta ketelatenan ikut merawat semua anak sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Bapak Soenarjo dan Ibu Soeprapti Soenarjo, beliau berdua bagaikan pengganti kedua orang tua saya sekaligus induk semang selama saya di Yogya. Dengan ketulusan dan kasih sayang beliau selalu memberi doa restu serta dorongan semangat sehingga memberi kedamaian, ketenangan selama melakukan penelitian di Yogya.

Semua saudara kandung saya tercinta yang berjumlah 11 orang beserta keluarga: Kol. Art. H. Rudi Landung Budhy, SIP dan istri Hj. Tatat Suhartati; drg. Isminiati Budhy P dan suami Letkol Purn. Sutrisno; Rowely Budhy dan suami Drs. Soerojo Atmodjo; Hj. Tuty Budhy P dan suami Kol. PSK. H. Djoko Winoto, SIP; Ir. Budhy Agung S dan istri Endang Herliyanti, Amd; Eny Budhy P.R; Drs. Budhy Guntur, Ir dan istri Iwing Sriwiharti, SH; Dra. Hj. Siswi Budhy S dan suami Drs. Kombes H. Anton Setiadi, SH, MHum; Drs. Ec. Budhy Hery S dan istri Candida Tresty Hastuti, SE, AK, Ir Subagio Budhy Putra dan istri Ruwi Julsi, SH; atas dorongan, semangat dan doa restunya sehingga pendidikan S3 ini dapat saya selesaikan.

Semua saudara ipar saya tercinta: Roberta Titik Diah, Dra, AK dan suami Letkol. Eko Suryantono, Drs. Apt, RHR Dody Sarjana. Drs dan istri Modesta Luluk. Dra; RHR. Perwito Utomo, SPsi.

Kepada ketiga anak saya tercinta: Laurensia Ratih Prahardhini, Fransisca Shancti Rosari, Rafael Andrew Radiant, mama sangat bersyukur dan bangga mempunyai anak seperti kalian yang selalu memberi dorongan, semangat dan doa serta pengertian walaupun terpaksa sering harus mama tinggalkan, namun kalian tetap tangguh, mandiri, mempunyai semangat juang yang tinggi dalam menjalani hidup, sehingga cita-cita dan studi kalian tetap

berjalan dengan baik. Semoga Tuhan selalu melimpahi kasih karunia yang besar pada kalian. Bagi semua anak lain yang juga mengalami hal serupa semoga diberi bimbingan dan petunjuk oleh Tuhan yang Maha Kasih dan Penyayang.

Rasa hormat dan terima kasih yang tidak terhingga kepada suami tercinta, Robertus Hendro Rumpoko H.S. Drs Ec, MM, yang telah dengan setia mendampingi saya selama 21 tahun, baik dalam duka maupun suka, dan dengan tulus ikhlas memberi ijin, dorongan, semangat terutama membantu mendidik dan mengawasi semua anak sehingga anak pertama dapat diterima di Perguruan Tinggi, semoga berkah Tuhan selalu menyertai kita sekeluarga.

Tidak lupa juga pada Mbak Ismiati dan Mbak Wiji Lasmini yang turut menyelesaikan pekerjaan di rumah dan di praktek sehingga tugas saya menjadi lebih ringan.

Semua pihak dan handai taulan serta para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, baik secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan disertasi saya.

Sebagai manusia biasa tidak lepas dari khilaf serta kesalahan baik tutur kata maupun tindakan kepada siapa saja terutama dalam masa pendidikan S3, saya dengan tulus hati mohon maaf sebesar-besarnya.

Pada akhirnya saya hanya dapat memanjatkan puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Kuasa, atas segala tuntunan, kekuatan dan keberhasilan yang telah saya terima. Semoga Tuhan selalu memberikan petunjuk, semangat dan kemudahan bagi kita semua yang berusaha mengembangkan ilmu kedokteran di negeri tercinta, Indonesia.

RINGKASAN

**KARSINOGENESIS KARSINOMA SEL SKUAMOSA RONGGA MULUT
YANG TERINFEKSI EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BERDASAR
EKSPRESI p53, c-myc DAN bcl-2**

Theresia Indah Budhy

Karsinoma sel skuamosa merupakan jenis kanker yang paling sering ditemukan di rongga mulut, di daerah kepala dan leher kurang lebih 90%. Berdasarkan letak geografis, insidens Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut (KSSRM) mempunyai berbagai variasi yang berbeda. Kemungkinan hal ini berkaitan dengan suku, budaya, kebiasaan dan sosial ekonomi. Di Jawa Timur insiden jenis kanker ini sebesar 2,64% dan meningkat terus setiap tahun. Salah satu faktor penyebab karsinoma adalah virus. *Epstein-Barr Virus* (EBV) adalah salah satu virus yang mempunyai potensi karsinogenesis. EBV merupakan famili herpesviridae yang dapat menginfeksi sel melalui ikatan antara reseptor CD 21 yang terdapat pada epitel dengan gp 350/220 yang ditemukan pada kapsul virus. Setelah infeksi primer virus akan menetap secara laten di dalam sel manusia. Secara berkala virus akan memproduksi gen yang mengganggu regulator proliferasi dan apoptosis seperti p53, c-myc, dan bcl-2.

Melalui pendekatan paradigma patobiologi molekuler maka peneliti ingin mengetahui mekanisme proliferasi dan apoptosis pada KSSRM yang terinfeksi EBV. Pada penelitian observasional analitik dengan pendekatan *cross-sectional* ini didapat hasil tentang infeksi EBV pada karsinoma sel skuamosa. Deteksi infeksi EBV dengan cara *in situ* hibridisasi untuk melihat RNA-EBV (EBER) dan imunohistokimia untuk mengetahui ekspresi *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) dan *EBV Nuclear Antigen-1* (EBNA-1). Dari hasil deteksi EBV tersebut terdapat perbedaan bermakna antara 3 variabel. Untuk memberi gambaran peran ketiga produk gen EBV tersebut terhadap karsinogenesis maka dilakukan penelitian terhadap ekspresi protein regulator proliferasi dan apoptosis yaitu p53 inaktif, c-myc dan bcl-2. Dari hasil pemeriksaan ekspresi terdapat perbedaan bermakna ekspresi p53, c-myc, dan bcl-2 pada karsinoma sel skuamosa yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV, dan kontrol.

Pada penelitian ini dibuat kelompok baru mekanisme proliferasi dan apoptosis berdasar variabel EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2, yaitu kelompok baru 1, 2, dan 3. Pada kelompok baru 1 (kb-1), mekanisme proliferasi dan apoptosis banyak diperankan oleh variabel c-myc sebagai faktor transkripsi dan diikuti oleh p53 inaktif. Infeksi EBV tercermin pada ekspresi RNA EBV (EBER), kemudian diikuti ekspresi

Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) dan *Nuclear Antigen EBV-1 (EBNA-1)*, sedangkan *bcl-2* kurang berperan pada kb-1.

Pada kelompok baru-2 (kb-2) mekanisme proliferasi dan apoptosis sangat didominasi oleh peran *p53* inaktif, sedangkan faktor transkripsi *c-myc* mempunyai pengaruh yang lebih rendah dibandingkan *p53* inaktif. Infeksi EBV banyak didominasi EBER dan LMP-1. EBNA-1 juga lebih kecil dibanding produk gen EBV yang lain, sedangkan *bcl-2* kurang berperan pada kelompok baru-2.

Pada kb-3 mekanisme proliferasi dan apoptosis lebih banyak diperankan oleh *p53* inaktif dan *bcl-2*, sedangkan *c-myc* justru lebih sedikit. Produk gen EBV banyak diperankan oleh ekspresi EBNA-1, sedangkan dua yang lain kurang berperan.

Selain tiga kelompok baru juga didapatkan kelompok KSSRM yang tidak terinfeksi EBV. Pada kelompok ini tidak ditemukan ekspresi EBER, LMP-1, dan EBNA-1. Mekanisme proliferasi dan apoptosis terutama diperankan oleh *p53* inaktif, kemudian diikuti oleh *c-myc*, dan terakhir *bcl-2*.

Pada penelitian ini juga diperiksa kelompok kontrol (sel normal). Pada kelompok ini tidak ditemukan infeksi EBV. Pada sel normal tersebut, ekspresi *c-myc* berperan sebagai faktor transkripsi. Ekspresi *p53* dan *bcl-2* sebagai regulator tumor supresor tidak didapatkan.

Pada kelompok baru tersebut dibuat pola mekanisme proliferasi dan apoptosis (*molecular grading*) KSSRM yang terinfeksi EBV. Melalui analisis diskriminan didapatkan 5 diskriminator, yaitu EBER, LMP-1, EBNA-1, *p53* inaktif dan *c-myc*.

Pada KSSRM pola "*molecular grading*"-1 yang paling banyak memberi kontribusi terhadap mekanisme proliferasi dan apoptosis adalah faktor transkripsi *c-myc*, sedangkan peran *p53* inaktif kurang. Peran EBV terhadap proliferasi dan apoptosis sel kanker terutama oleh EBER, sedangkan ekspresi LMP-1 dan EBNA-1 lebih sedikit.

Pada pola "*molecular grading*"-2 kontribusi EBER terhadap proliferasi dan apoptosis sel kanker sangat banyak. Selain itu aktivitas *p53* inaktif sangat tinggi, sedangkan LMP-1 sedikit dan EBNA-1 jauh lebih kecil. Kontribusi faktor transkripsi *c-myc* kurang berperan.

Pada pola "*molecular grading*"-3 mekanisme proliferasi dan apoptosis banyak diperankan oleh EBNA-1, sedangkan lainnya tidak memben kontribusi.

Pada pola "*molecular grading*" kelompok KSSRM yang tidak terinfeksi EBV, p53 inaktif dan c-myc memberi kontribusi walau sangat kecil terhadap mekanisme proliferasi dan apoptosis.

Pada pola kelompok kontrol, tidak tampak peranan baik infeksi EBV maupun regulator proliferasi dan apoptosis pada KSSRM yang terinfeksi EBV.

Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai KSSRM yang terinfeksi EBV terutama genom subtype yang dominan pada KSSRM.



SUMMARY

THE CARCINOGENESIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA INFECTED BY EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BASED ON THE EXPRESSION OF p53, c-myc AND bcl-2

Theresia Indah Budhy

Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a type of cancer most commonly found in oral cavity and the area of head and neck, with a proportion of 90%. Based on geographic location, the incidence of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is varied, which is likely related to ethnicity, culture, habit, and economic and social status. In East Java the incidence of OSCC is about 2.64% and it increases every year. Virus is known as one of the main factors that result in this disease. Epstein-Barr Virus (EBV) is one of the viruses that has carcinogenic potential. EBV, belonging to the family of herpesviridae, may infect cell through the binding of CD 21 receptor of the epithelium with glycoprotein 350/220 found in the virus capsule. After primary infection virus will remain latent in human cell. Periodically virus will product gene that can disturb proliferative and apoptotic regulator such as p53, c-myc and bcl-2.

Based on molecular pathobiology paradigm, this study was aimed to disclose the proliferative and apoptotic mechanism in EBV-infected OSCC. This analysis observational study using cross sectional design revealed the outcome of EBV infection in OSCC. Detection of EBV infection was carried out by in situ hybridization to identify RNA EBV (EBER) and immunohistochemical analysis to find the expression of Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) and EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1). From the results of EBV detection, there were significant differences among three variables. To describe the role of the three genes to carcinogenesis, this study observed the expression of proliferating regulator protein and apoptosis, i.e. inactive p53, c-myc and bcl-2. The results of expression examination showed significant difference in the expression of inactive p53, c-myc, bcl-2 in OSCC that was infected and non-infected by EBV and control.

In this study, we formed three new groups of proliferative and apoptotic mechanism based on the variables of EBER, LMP-1, EBNA-1, inactive p53, c-myc, and bcl-2, i.e., new group-1 (kb-1), new group-2 (kb-2) and new group-3 (kb-3). In kb-1, proliferative and apoptotic mechanism was mostly acted by c-myc as the transcription factor, followed by inactive p53. EBV infection is reflected in the expression of RNA EBV (EBER) followed by the expression of Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) and

Nuclear Antigen EBV-1 (EBNA-1), while bcl-2 had less remarkable role in kb-1.

In the second new group (kb-2) proliferative and apoptotic mechanism was much predominated by inactive p53. The expression of c-myc had less remarkable role compared to p53. EBER and LMP-1 had more remarkable role in EBV infection, while EBNA-1 had a less remarkable than other EBV products. The expression of bcl-2 had less action in this group. In the third new group (kb-3) the proliferative and apoptotic mechanism was more remarkably played by inactive p53 and bcl-2, while the role of c-myc was less remarkable. EBV gene product resulted more by the action of EBNA-1 expression, while the two others were less.

In addition to the new groups, there were also OSCC groups not infected with EBV. In this group there was no expression of EBER, LMP-1, and EBNA-1. Proliferative mechanism and apoptosis played primarily by inactive p53, followed by c-myc and bcl-2. In this study, control group (normal cell) was also examined. EBV was not found in this group. In normal cell, the expression of c-myc played as transcription factor. The expression of p53 and bcl-2 as tumor suppressor regulator was not found.

In the new group, the pattern of proliferative and apoptotic mechanism (molecular grading) of EBV-infected OSCC was created. By using discriminant analysis, we obtained 5 discriminators, i.e., LMP-1, EBNA-1, inactive p53 and c-myc.

In OSCC with molecular grading-1, the transcription factor c-myc provided the major contribution to the proliferative mechanism and apoptosis, while the role of inactive p53 was less. The role of EBV in the proliferation and apoptosis of cancer cells was primarily acted by EBER, while the expression of LMP-1 and EBNA-1 were less. In molecular grading-2, the contribution of EBER to the proliferation and apoptosis of cancer cells was high. Additionally, the activity of inactive p53 was very high, while LMP-1 was less and EBNA-1 far less. The contribution of c-myc transcription factor was also less. In molecular grading-3, the proliferative mechanism and apoptosis were played particularly EBNA-1, while the others gave no contribution. In molecular grading of OSCC group not infected with EBV, inactive p53 dan c-myc gave contribution, although highly minor to the proliferative mechanism and apoptosis.

In control group, the role of either EBV or proliferative regulator and apoptosis in EBV-infected OSCC was not found.

It is recommended to undertake further studies on EBV-infected OSCC, particularly to investigate predominant genome subtype in OSCC.

ABSTRACT

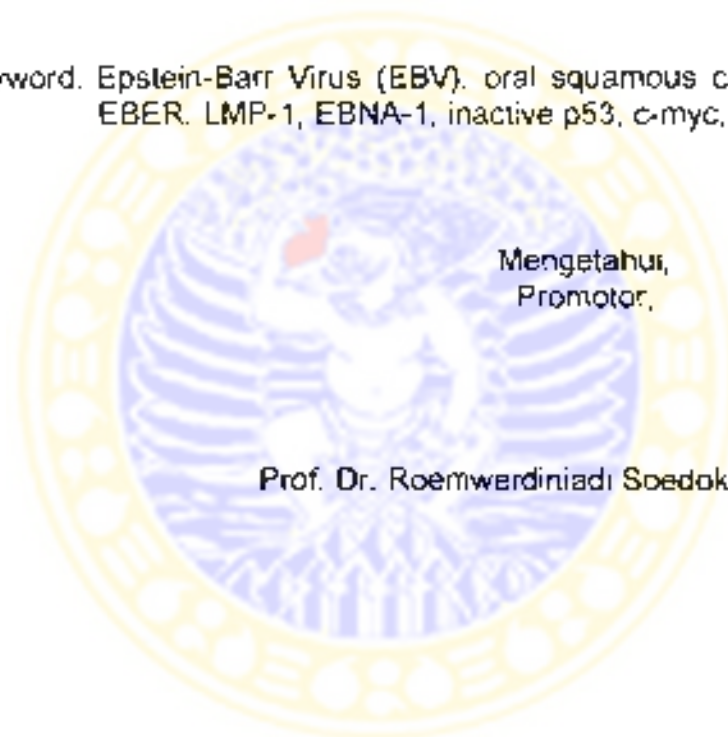
THE CARCINOGENESIS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA INFECTED BY EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BASED ON THE EXPRESSION OF p53, c-myc AND bcl-2

Theresia Indah Budhy

Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a type of cancer often found in oral cavity and the area of head and neck. SCC comprises 90% other cancers frequently found in those area. In East Java the incidence of Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is about 2.64% and it increases every year. Virus is known as one of the main factors that result in this disease. After primary infection virus will remain latent in human cell. Periodically virus will product gene that can disturb proliferative and apoptotic regulator such as p53, c-myc and bcl-2. Based on molecular pathobiology paradigm this study was intended the proliferative and apoptotic mechanism in OSCC that was infected by Epstein-Barr Virus (EBV). This analysis observational study using cross sectional design revealed the outcome of EBV infection on OSCC. This study found 35 cases in which 17 OSCC cases were infected by EBV, 8 OSCC cases were not infected by EBV and 10 cases normal cell (control). Detection of EBV infection could be done by insitu hybridization to identify RNA EBV (EBER) and by immunohistochemical analysis to find the expressions of (1) Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) and (2) EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1). There were some significant differences among three variables ($p < 0.05$). To describe the role of three genes to carcinogenesis this study observed cell proliferation and apoptosis regulator i.e., inactive p53, c-myc and bcl-2. The detection of the expression of inactive p53, c-myc and bcl-2 could be done by immunohistochemical analysis. There were some significant different expression of inactive p53, c-myc, bcl-2 on OSCC that was infected and non infected by EBV and control ($p < 0.05$). In this research was formed three new groups of proliferative and apoptotic mechanism based on the variables that were tested, such as new group-1 (kb-1), new group-2 (kb-2), new group-3 (kb-3). In the first new group (kb-1) proliferative and apoptotic mechanism was mostly acted by the expression of c-myc and was followed by inactive p53. Most of EBV infection could be seen in LMP-1 expression and then was followed by EBNA-1, while the role of the expression of bcl-2 and EBER also had less remarkable in this group. In the second new group (kb-2) proliferative and apoptotic mechanism was more predominated by inactive p53. The expression of c-myc had less remarkable role compared to p53. EBER and LMP-1 had more

remarkable role while EBNA-1 also had a less remarkable than other EBV genes. The expression of bcl-2 had less action in this group. In the third new group (kb-3) proliferative and apoptotic mechanism played more remarkably by EBNA-1, while the role of c-myc was less. EBV infection resulted more by the action of EBNA-1 while the two others were less. The use of discriminant analysis to the new groups, five discriminators were found i.e., EBER, LMP-1, EBNA-1, inactive p53 and c-myc. Conclusion Oral squamous cell carcinoma can be infected by Epstein-Barr Virus (EBV) such as EBER, LMP-1 and EBNA-1. Based on molecular pathobiology this study disclosed the expression of inactive p53, c-myc and bcl-2 that could be used for explaining the occurrence mechanism of EBV infected oral squamous cell carcinoma.

Keyword. Epstein-Barr Virus (EBV), oral squamous cell carcinoma, EBER, LMP-1, EBNA-1, inactive p53, c-myc, bcl-2.



Mengetahui,
Promotor,

Prof. Dr. Roemwardiniadi Soedoko, dr, Sp PA.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	xi
SUMMARY	xiv
ABSTRACT	xvi
DAFTAR ISI	xviii
DAFTAR TABEL	xxii
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN	xxv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat	8
1.4.1 Ilmiah	8
1.4.2 Praktis	8

BAB 2 STUDI PUSTAKA

2.1 Proliferasi Sel	9
2.2 Gen Pengatur Proliferasi	14
2.2.1 Proto-onkogen	14
2.2.2 Tumor suppressor gen	15
2.3 Implikasi kelainan siklus sel terhadap keganasan.....	18
2.4 Peranan virus dalam karsinogenesis	22
2.5 Aktivitas gen suppressor p53	27
2.6 Apoptosis	33
2.6.1 Jalur apoptosis dan berbagai molekul yang terlibat ..	36
2.6.2. Disregulasi apoptosis pada kanker	44
2.7 Virus	46
2.7.1 Epstein-Barr Virus (EBV)	49
2.8 Karsinoma Rongga Mulut	57
2.8.1 Mukosa rongga mulut	57
2.8.2 Karsinoma sel skuamosa rongga mulut	59
2.9 Insitu Hybridization	60
2.9.1 Hibridisasi asam nukleat	60
2.9.2 Strategi hibndisasi	62
2.9.3 Peiacak	64
2.9.4 Hibndisasi dengan radioaktif	66
2.9.5 Hibridisasi non-radioaktif	68
2.9.6 Imunohistokimia	71

2.9.7 Metode peroksidase anti peroksidase	72
2.9.8 Avidin biotin complex	73
2.9.9 Alkalifofatase anti alkalifosfatase	74
2.9.10 Metode streptavidin biotin	74
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1. Bagan Kerangka Konseptual	76
3.2. Keterangan Bagan Kerangka Konseptual	77
3.3. Hipotesis	78
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis Penelitian	79
4.2 Rancangan Penelitian	79
4.3 Penentuan Besar Sampel	80
4.4 Variabel Penelitian	82
4.5 Batasan Operasional	82
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	83
4.6.1 Lokasi	83
4.6.2 Waktu	84
4.7 Populasi Penelitian	84
4.8 Kriteria Sampel dan Kriteria Inklusi	85
4.8.1 Kriteria sampel	85
4.8.2 Kriteria inklusi kelompok kasus	85
4.9 Cara Kerja	87

4.10 Unit Analisis	90
4.11 Analisis Data	91
4.12 Etik Penelitian	91
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS	
5.1 Infeksi EBV pada Sel Kanker	92
5.2 Kelompok Baru Karsinoma Sel Skuamosa	94
5.3 Penentuan Diskriminator	96
5.4 Mekanisme Proliferasi dan Apoptosis	96
BAB 6 PEMBAHASAN	102
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan	118
7.2 Saran	119
DAFTAR PUSTAKA	120
LAMPIRAN-LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Beberapa virus penyebab kanker	24
Tabel 5.1	Jumlah anggota sampel pada KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol	93
Tabel 5.2	Perbedaan ekspresi EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 pada kelompok KSSRM yang terinfeksi dan tidak terinfeksi EBV dan kontrol	93
Tabel 5.3	Kelompok baru KSSRM yang terinfeksi berdasarkan EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2 dan tidak infeksi serta kontrol	94
Tabel 5.4	Koefisien Fisher's dan setiap diskriminator kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol	96
Tabel 5.5	Nilai score diskriminator (EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc) pada kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol	97

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Interaksi antara virus Epstein-Barr, onkogen c-myc dan B-lym dalam patogenesis Limfoma Burkitt	27
Gambar 2.2	Berbagai siklin pengatur siklus sel	29
Gambar 2.3	p53 <i>check point</i> pada <i>G1 arrest</i>	33
Gambar 2.4	Fase induksi dan fase efektor apoptosis melalui TCR	39
Gambar 2.5	Peran p53 pada apoptosis	44
Gambar 2.6	Peta genom episom Epstein-Barr virus pada infeksi laten	52
Gambar 2.7	Skema teknik hibridisasi Southern	68
Gambar 2.8	Deteksi kemiluminesen dari DNA target B. biotin; AP, fosta fase alkali	70
Gambar 5.1	Grafik kelompok baru KSSRM yang terinfeksi berdasarkan EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2 dan tidak infeksi serta kontrol	95
Gambar 5.2	Pola diskriminan ('molekuler grading') dari diskriminator EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc pada kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi dan kontrol	97
Gambar 5.3	Sel kanker dengan <i>insitu hybridization</i> EBER, inti berwarna coklat kehitaman dan kecil	98
Gambar 5.4	Sel kanker dengan ekspresi LMP-1, menggunakan <i>monoclonal antibody</i> LMP-1 pada membran inti berwarna coklat kehitaman	98
Gambar 5.5	Sel kanker dengan ekspresi EBNA-1, menggunakan <i>monoclonal antibody</i> EBNA 1. pada inti berwarna coklat kehitaman	99

Gambar 5.6	Sel kanker dengan ekspresi c-myc, menggunakan <i>monoclonal antibody</i> c-myc pada inti berwarna coklat kehitaman	99
Gambar 5.7	Sel kanker dengan ekspresi bcl-2, menggunakan <i>monoclonal antibody</i> bcl-2 pada sitoplasma berwarna coklat kehitaman	100
Gambar 5.8	Sel kanker dengan ekspresi p53 inaktif, menggunakan <i>monoclonal antibody</i> p53 inaktif pada inti berwarna coklat kehitaman	100
Gambar 5.9	Epitel skuamus normal dengan pengecatan HE	101



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Surat Keterangan Kelaikan Etik Penelitian
- Lampiran 2 Gambaran Klinis Penderita Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut Periode 2002 s/d 2003
- Lampiran 3 Prosedur Kerja Insitu Hybridization
- Lampiran 4 Prosedur Kerja Imunohistokimia
- Lampiran 5 Statistik



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Di Indonesia insidens kanker rongga mulut masih cukup tinggi, bahkan selalu terjadi peningkatan setiap tahun. Sesuai dengan laporan Budhy (1995) terjadi jumlah kasus baru 2,64% setiap tahun. Di Amerika kanker rongga mulut ini sebesar 3% dari seluruh kanker timbul pada pria, sedangkan wanita 2% (Peters, 2002). Kanker rongga mulut adalah peringkat ke 6 dari seluruh kanker yang paling sering terjadi di dunia (Hsieh, 2001). Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) merupakan jenis kanker yang sering ditemukan di rongga mulut atau di kepala dan leher (Cotran, 1999; Peters; 2002). Faktor penyebab yang kompleks merupakan hal yang perlu diperhatikan. Salah satu penyebab kanker adalah virus (Cotran, 1999). *Epstein Bar Virus* (EBV) merupakan virus yang sering dikaitkan dengan karsinoma di Nasofaring, *Burkitt's lymphoma*, *Peripheral T cel lymphoma*. Pada awal infeksi sering asimtomatis kemudian berlanjut pada fase laten. Pada fase tersembunyi (laten) akan diekspresi gen laten yaitu RNA EBV (EBER), antigen nuklear EBV (EBNA) dan laten membran protein (LMP). EBV didapatkan pada kelenjar saliva dan 80% aktif di dalam saliva (Hu, 2003). Dilaporkan Higa et al (2002) bahwa pada KSSRM



penduduk Okinawa Jepang ternyata juga banyak berhubungan dengan infeksi EBV. Reed JC (1999) mengatakan pada EBV didapatkan gen yang homolog dengan *bcl2* sebagai anti apoptosis, kemudian ditambahkan bahwa LMP1 menyebabkan *upregulate bcl2*. Produk genom EBV yang lain adalah EBNA-1, dikaitkan dengan sel inang selama proses mitosis, yaitu dapat meningkatkan E2F yang berperan terhadap siklus sel (Middeldorp et al, 2003). Menurut Cotran (1999) bahwa karsinogenesis dapat terjadi karena gangguan mekanisme pada gen supresor tumor, onkogen dan gen apoptosis. Salah satu gen yang banyak dikaitkan, baik dengan apoptosis maupun proliferasi sel adalah p53 (Israel, 1996). Gen p53 merupakan gen supresor tumor karena mempunyai peran dalam pengaturan apoptosis bila terjadi kerusakan DNA. Selain itu gen supresor tumor pada karsinogenesis ditentukan oleh peran onkogen. Salah satu onkogen tersebut adalah *c-myc* yang berfungsi sebagai faktor transkripsi dan banyak dikaitkan dengan transformasi sel. Pada apoptosis banyak diperankan oleh family gen *bcl-2*. Walaupun telah banyak dilaporkan penelitian EBV dan gen regulator kanker tetapi sampai saat ini peran infeksi EBV terhadap mekanisme proliferasi dan apoptosis sel kanker pada karsinogenesis KSSRM belum terungkap.

EBV merupakan famili dari *Herpesviridae*. Keberadaan virus ini sudah menyebar hampir ke seluruh dunia (Kief, 1996). Hasil

penelitian secara *invivo*. EBV dapat menginfeksi, baik pada limfoid maupun jaringan epitel nasofaring. Genom virus ini didapatkan tersembunyi secara konstan di sel dengan ekspresi kuat protein EBV. *nuclear antigen complex* (EBNA), *membran protein latent* (LMP 1 dan LMP 2) dan EBV-RNA (EBER). Ekspresi protein EBV ini akan ikut berperan pada proses regulasi protein di dalam sel. Bila ekspresi protein EBV mengganggu regulasi protein yang berperan terhadap kontrol siklus sel, seperti ekspresi p53, c-myc dan bcl-2, maka proliferasi dan apoptosis sel akan terganggu. p53 berfungsi menghentikan siklus sel bila terjadi gangguan atau kerusakan gen dalam sel. Bila EBV masuk ke dalam sel kemudian mengubah fungsi p53 maka kontrol regulasi siklus sel terganggu. Secara terus menerus sel akan membelah atau mitosis sehingga menimbulkan proliferasi berlebihan. Karsinogenesis dapat terjadi, baik karena gangguan pada onkogen maupun supresor gen. Bila keberadaan EBV yang laten di dalam sel epitel rongga mulut mampu menyebabkan disregulasi kontrol p53, c-myc dan bcl-2 maka hal ini akan menyebabkan sel menjadi tidak mati (*immortal*). Keadaan ini dapat menyebabkan transformasi menjadi sel kanker. Kemampuan EBV ini sangat berbahaya oleh karena itu harus segera dicari cara untuk mengatasi keadaan tersebut. Bila peranan EBV terhadap karsinogenesis KSSRM tersebut dapat terungkap maka dapat segera dilakukan pencegahan secara dini terhadap kanker ini.

EBV yang telah menginfeksi epitel akan menetap tersembunyi dan secara periodik menjadi aktif kembali (reaktif). Hal ini didukung penemuan oleh Hu, Li Fu (1996) bahwa di *hairy leukoplakia* ditemukan partikel EBV sebanyak hampir 100%. Demikian pula laporan Cruz bahwa infeksi EBV dapat dideteksi pada berbagai lesi, antara lain pada liken planus tanpa *dysplasia*, dan leukoplakia tanpa *dysplasia* sebesar 50%; sedangkan leukoplakia dengan *dysplasia* 100%; dan *erythroplakia* dengan *dysplasia* 100% juga pada KSSRM 100% (Cruz et al, 1999). Epitel dapat terinfeksi EBV karena mempunyai reseptor CD21 yang homolog dengan *glycoprotein (gp) 350/220*, komplementer pada bagian *envelope protein* EBV. Setelah infeksi EBV melalui epitel rongga mulut maka DNA EBV yang diselubungi oleh nukleokapsid akan dilepaskan ke dalam inti sel (Legenaur, 1999). Genom virus EBV akan berada pada sel inang dalam bentuk *episome latent* (Aitken, et al. 1994). *Episome latent* virus EBV terdiri atas beberapa genom, di antaranya adalah EBER, LMP-1 dan EBNA-1. (Middeldorp, 2003). Genom virus tersebut akan direplikasi selama pembelahan sel inang. Mengingat hal itu, maka genom virus akan selalu berada dalam sel inang, keadaan ini berpengaruh terhadap berbagai gen regulator dan replikasi sel inang. Dilaporkan pula oleh Middeldorp (2003) bahwa produk genom EBV dapat mengaktifasi faktor transkripsi. Yamamoto, et al, (2000) melaporkan bahwa genom EBV dapat menghambat apoptosis sel.

Proliferasi dan apoptosis sel ditentukan oleh regulator gen supresor tumor, onkogen dan apoptosis. Gen *c-myc* adalah salah satu onkogen sebagai faktor transkripsi yang banyak dikaitkan dengan keganasan. Gondhowiardjo (1998) melaporkan bahwa *c-myc* ini akan bekerja pada posisi yang berlawanan dengan gen supresor tumor *p53*. Ketika terjadi aktivasi *c-myc* berlebihan, maka akan terjadi transaktivasi terhadap *p53* untuk menghambat. Akibat terinfeksi virus kemampuan genom *p53* ini akan inaktif. Apabila terjadi inaktivasi gen *p53*, maka peningkatan aktivitas *c-myc* tidak dapat dihambat. Keadaan ini menyebabkan proliferasi yang tidak terkendali. Keterkaitan genom EBV dalam bentuk *episome latent* dengan keganasan, pernah dilaporkan Nicholson (1997) bahwa ekspresi LMP-1 pada epitel *human cell line* menyebabkan transformasi sel. Selain itu ekspresi genom LMP-1 dapat mengaktivasi faktor transkripsi dan apoptosis (Brodeur et al, 1997). Di sisi lain genom EBV EBER ikut berperan terhadap keganasan dengan menghambat aktivitas inhibitor faktor transkripsi E2F (Middeldorp, 2003), selain itu EBER menghambat apoptosis sel (Shikosawa et al, 2000). Genom EBV lainnya yang banyak dikaitkan dengan keganasan adalah EBNA-1. Ekspresi EBNA-1 ini dapat meningkatkan faktor transkripsi, selain itu genom ini dibutuhkan oleh genom EBV yang lain karena mampu mempertahankan *episome* di dalam inti. Mengingat kemampuan genom EBV tersebut yang dapat

menyebabkan gangguan berbagai gen regulator, baik supresor tumor, onkogen maupun apoptosis, maka keadaan ini dapat menginduksi karsinogenesis sel epitel. Peneliti berusaha menemukan penjelasan peran infeksi EBV terhadap karsinogenesis KSSRM. Penelitian karsinogenesis KSSRM ini menggunakan kerangka berpikir (paradigma) patobiologi molekuler, terhadap ekspresi genom p53 inaktif, c-myc dan bcl-2.

Dari permasalahan tersebut maka dapat ditemukan berbagai teori sebagai dasar konsep solusi. EBV adalah virus DNA, yang dapat masuk ke dalam sel epitel mukosa rongga mulut melalui ikatan ber-reseptor CD21. EBV setelah terinfeksi dalam sel epitel bersifat laten dalam bentuk episome, dan secara periodik akan reaktif dan bereplikasi. *Episome latent* ini terdiri atas beberapa genom antara lain EBV-RNA (EBER); EBNA-1 dan LMP-1. Berbagai produk gen EBV tersebut dapat mengubah fungsi kontrol regulasi proliferasi sel dan apoptosis. Gen yang mempunyai kemampuan mengatur regulasi proliferasi dan apoptosis adalah p53, c-myc dan bcl-2. Infeksi EBV yang menetap secara tersembunyi akan menyebabkan gangguan sistem regulasi proliferasi dan apoptosis pada karsinogenesis KSSRM. Dengan meneliti berbagai perubahan ekspresi protein yang menyandi gen proliferasi dan apoptosis, maka akan dapat ditemukan mekanisme proliferasi dan apoptosis pada karsinogenesis KSSRM yang terinfeksi EBV.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada perbedaan ekspresi EBER, EBNA-1, LMP-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 antara kelompok KSSRM yang terinfeksi EBV, tidak terinfeksi EBV dan kontrol?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan umum

Mengungkap mekanisme karsinogenesis berdasar regulator proliferasi dan apoptosis di karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi EBV.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mendeteksi infeksi *Epstein-Barr virus* (EBV) di karsinoma sel skuamosa rongga mulut dan kontrol (EBER, EBNA-1, LMP-1)
2. Membuktikan perbedaan ekspresi EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 pada kelompok KSSRM yang terinfeksi dan tidak terinfeksi EBV dan kontrol.
3. Mendapatkan kelompok baru karsinoma sel skuamosa rongga mulut berdasarkan EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2.
4. Mendapatkan mekanisme pola "molekuler grading" berdasarkan diskriminator EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi EBV.

1.4 Manfaat

1.4.1 Ilmiah

1. Mendapat penjelasan mekanisme proliferasi dan apoptosis melalui pendekatan patobiologi molekuler pada karsinogenesis karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi EBV.
2. Mengungkap peran infeksi EBV melalui produk gen EBER, LMP-1, EBNA-1 terhadap aktivitas gen tumor supresor dan onkogen pada karsinogenesis karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

1.4.2 Praktis

1. Dapat digunakan sebagai konsep dasar sistem penilaian aktivitas proliferasi dan apoptosis sel kanker yang terinfeksi EBV berdasarkan ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2.
2. Dapat digunakan sebagai landasan pengembangan deteksi dini dan terapi pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

BAB 2

STUDI PUSTAKA

2.1 Proliferasi Sel

Proliferasi sel ialah pertumbuhan yang terjadi baik pada jaringan maupun organ sebagai akibat penambahan ukuran, jumlah sel, populasi sel yang aktif melakukan siklus sel atau proliferasi. Manusia dewasa merupakan hasil pertumbuhan akibat penambahan sebanyak 10 sel dari sebuah sel yang dibuahi, di samping terdapat juga faktor penambahan ukuran sel sebanyak 3-4 kali semenjak manusia dilahirkan (Tubiana, 1989). Setelah manusia dewasa, maka jumlah sel relatif tetap dan tidak terjadi penambahan sel. Mitosis atau pembelahan sel merupakan bagian dari proses proliferasi. Pembelahan sel pada manusia dewasa bertujuan untuk menggantikan sel mati, yang diakibatkan oleh proses apoptosis maupun nekrosis (Willie, 1998). Keseimbangan dalam pertumbuhan ini harus terkontrol. Bila jumlah sel yang mati lebih banyak, maka akan terjadi penciutan jaringan atau organ. Hal ini terjadi secara fisiologis pada orang tua. Apabila sel diproduksi lebih banyak dari sel yang harus digantikan, maka akan terjadi pertumbuhan jaringan berlebihan.

Proses *cell cycle* atau siklus pembelahan sel berlangsung melalui mekanisme waktu tertentu yaitu melalui jarak atau fase

pengaturan reaksi yang saling berkaitan. Hal yang penting dari proses ini adalah kelangsungan setiap fase reaksi itu diatur oleh petunjuk waktu internal (*internal clock*) (Murray, 2000). *Cell cycle clock* atau waktu pembelahan sel tersebut dipengaruhi oleh aktivitas periodik kompleks cyclin-cdk. Fase ini juga dikendalikan oleh fase tertentu yang disebut *cell cycle decision points* atau *checkpoints*. Hal ini menyebabkan *cell cycle* dapat dihentikan secara *reversible* sebagai respons terhadap sinyal baik eksternal maupun internal (Hanahan, 2000). Berbagai faktor dapat juga berpengaruh dalam pengaturan mekanisme proliferasi ini. Faktor tersebut dapat berasal dari ekstraseluler seperti nutrisi.

Berdasarkan kinetika sel yang berproliferasi, dalam populasi sel terdapat empat kompartemen dengan fungsi yang berbeda. Kompartemen pertama adalah kelompok sel yang aktif melakukan proses pembelahan sel atau proliferasi dikenal sebagai *growth fraction* (GFr). Kedua adalah sel dalam keadaan diferensiasi terminal. Ketiga adalah sel dalam fase Go, yaitu tahap pembelahan tetapi sel tidak membelah dan juga tidak mati. Keadaan ini karena sel akan masuk kembali ke dalam siklus pembelahan. Apabila sel tersebut tidak diperlukan maka akan mengalami kematian. Terakhir adalah kelompok sel mati yang berasal dari kelompok kedua maupun kelompok ketiga.

Waktu di antara dua mitosis ini atau pembelahan sel disebut waktu siklus sel. Fase antara akhir mitosis dan awal proses mitosis selanjutnya, dikenal sebagai interfase. Fase di dalam *cell cycle* dibagi dalam periode waktu yang disebut fase *gap 1* (G1), *synthesis* (S), dan *gap 2* (G2) dan mitosis(M)(King, 2000). Fase G1 adalah fase persiapan sel untuk melakukan replikasi DNA, yaitu pembentukan berbagai RNA dan protein yang berperan dalam proses replikasi. Permulaan replikasi DNA terjadi saat peralihan fase akhir G1 dan fase selanjutnya yang disebut fase S. Selama fase S jumlah DNA semuanya akan bertambah dari diploid (2n) hingga replikasi komplet (4n). Fase G2 yaitu waktu dari akhir fase S sampai mitosis atau pembelahan. Pada fase ini sel akan mempersiapkan diri untuk membelah dan mempersiapkan dua set kromosom. Fase terakhir dari proses proliferasi adalah fase M (mitosis), yang merupakan fase paling cepat. Pada fase tersebut terjadi pemecahan DNA yang telah berduplikasi secara lengkap. Proses ini akan menghasilkan 2 anak sel dengan kromosom diploid (2n). Fase G₀ adalah fase sel dalam keadaan istirahat tidak aktif melakukan proses proliferasi.

Untuk dapat bermitosis, sel harus lebih dahulu memperbesar massa. Keadaan ini merupakan kelanjutan berbagai proses transkripsi dan translasi. Pada fase S terjadi pembesaran genom yang diperlukan untuk replikasi. Secara singkat dapat dikatakan

terdapat 2 fase fungsional pada *cell cycle* yaitu 1 fase pembelahan (S dan M) dan 2 fase persiapan (G1 dan G2).

Koordinasi proses yang kompleks ini merupakan hasil mengubah aktivitas serial enzim intraseluler yang dikenal sebagai *cyclin dependent kinases* (cdks). Bentuk aktif enzim ini terdapat dalam bentuk kompleks dengan protein spesifik. Protein spesifik dalam fase siklus sel ini disebut siklin. Mekanisme pembelahan sel terjadi bila terdapat aktivitas enzim kinase.

Sel secara sinambung harus berintegrasi dengan sinyal tersebut baik ekstraseluler maupun intraseluler untuk melanjutkan mekanisme kontrol terhadap replikasi dan pembelahan sel (Hanahan, 2000). Nutrisi, *cell-cell contact*, peptida ekstraseluler, merupakan faktor-faktor ekstraseluler yang dapat berpengaruh. Terdapat beberapa proses faktor ekstraseluler ini dapat berhubungan dengan komponen intraseluler, sehingga dapat mempengaruhi siklus sel. Sebagai contoh faktor pertumbuhan (GF) dapat mendorong sel pada fase G₀ untuk memasuki fase G1 yang aktif.

GF adalah molekul yang terdapat di lingkungan ekstraseluler. Molekul ini dapat mempengaruhi proliferasi maupun diferensiasi sel sasaran. Molekul GF akan dikenal oleh reseptor yang terdapat pada permukaan sel yang disebut *growth faktor receptor* (GFR). Berbagai penelitian membuktikan bahwa GFR merupakan protein yang terdiri

12



atas beberapa komponen. Komponen tersebut dibagi atas beberapa bagian yaitu yang berada di bagian luar sel merupakan bagian yang akan berkaitan dengan GF, komponen transmembran, dan protein *tirosin kinase* (TK) yang terletak di bagian dalam membran sel dan komponen ekor atau bagian dalam yang terdiri atas gugusan karboksi. Aktivasi GFR yang terjadi akibat ikatan dengan GF, hal ini merupakan rangsangan awal bagi serangkaian proses biokimia yang terjadi kemudian. Pengikatan komponen GFR diteruskan sebagai suatu sinyal melalui komponen transmembran kemudian akan menimbulkan berbagai perubahan pada tirosinkinase yang terletak di permukaan dalam membran. Komponen tirosin kinase dari GFR ini merupakan molekul protein sinyal, yang berfungsi sebagai perantara terhadap penyampai pesan (*messenger*) kedua.

Maka *messenger* kedua ini dengan segera meningkatkan jumlah setelah terjadi rangsangan GFR. Protein G merupakan contoh molekul *messenger* ke dua intrasitoplasma. Tahap selanjutnya akan mengaktifkan molekul lain yang terikat pada DNA di dalam nukleus. Proses aktivasi molekul yang terikat pada DNA tersebut akan mengakibatkan diaktifkan atau dinonaktifkan beberapa gen spesifik pengontrol proses pembelahan sel. Aktivitas molekul yang terikat pada DNA merupakan akhir *jaras signal trasduction*

Jaras signal trasduction merupakan kaskade peristiwa biokimia yang berupa jejaring (*network*) kegiatan, dimulai oleh

rangsangan GF ekstraseluler. hingga pengikatan protein tertentu pada DNA dalam nukleus sel, dan dimodulasi oleh protein produk berbagai proto-onkogen (Cantley, 1991). Dengan demikian perlu diketahui bahwa jalur ini sangat penting untuk mempertahankan fungsi fisiologis sel normal, begitu pula bahwa proto-onkogen yang berperan aktif dalam proses ini. Apabila terjadi mutasi pada gen ini, maka sangat mengganggu keseimbangan proses membelah sel. Keadaan ini akan berpengaruh pada proliferasi dan apoptosis sel.

2.2 Gen Pengatur Proliferasi

2.2.1 Proto-onkogen

Proto-onkogen adalah gen pengontrol sel yang terdapat pada genom manusia. Gen ini terdapat pada sel normal. Penamaan onkogen sebenarnya kurang tepat, namun istilah itu muncul karena pertama kali ditemukan pada sel kanker. Saat ini telah dikenal sekurang-kurangnya 100 proto-onkogen dan produknya. Keberadaan gen ini belum semua dapat diidentifikasi fungsinya dalam sel normal dan maligna. Walaupun belum semua dapat diidentifikasi, tetapi beberapa jalur proses proliferasi sel yang dikendalikan melalui berbagai produk proto-onkogen sudah dapat diidentifikasi.

Beberapa jenis produk proto-onkogen merupakan bagian dari *signal pathway transduction* (Cantley, 1991; Hanahan 2000). Jalur ini merupakan sarana komunikasi intraseluler. Jalur ini meneruskan

isyarat eksterna ke dalam nukleus kemudian sel akan memberikan respons yang sesuai. Dalam keadaan normal isyarat proliferasi sel sebagian besar diawali oleh rangsangan faktor pertumbuhan (*growth faktor* = GF). Salah satu proto-onkogen adalah *c-myc*, terdapat dalam kromosom 8, dan gen untuk imunoglobulin, pada kromosom 14.

2.2.2 Tumor supresor gen (TSG)

TSGs merupakan kelompok gen yang lebih baru ditemukan setelah onkogen, dikenal sebagai anti-onkogen, karena berfungsi melakukan kontrol negatif terhadap pertumbuhan sel (Lee, 1993).

TSGs yang pertama kali ditemukan adalah gen retinoblastoma (*rb*). Mutasi atau ketidakterdapatannya dalam sel dapat mengakibatkan kanker. Gen *Rb* terletak pada kromosom 13 dan menyandi protein dengan berat molekul 200 kilodalton (kDa). Pada fase gap 0 (*G₀*) dan gap 1 (*G₁*) dari siklus sel, protein *Rb* dapat dijumpai dalam bentuk kompleks dengan protein DP1 dan E2F. Pada fase ini protein *Rb* tidak terfosforilasi dan tidak aktif, tetapi pada akhir fase siklus *G₁* dan *synthesis* (*S*), terjadi aktivasi siklin *cdk2* menyebabkan fosforilasi protein *rb* tersebut. Hal ini menyebabkan E2F dan DP1 menjadi bebas dan dapat melangsungkan proses transkripsi. E2F dan DP1 merupakan faktor penting dalam proses transkripsi tersebut.

Gen p53 merupakan contoh lain kelompok TSGs, yang menyandi protein dengan berat molekul 53 kDa. Di samping berperan sebagai pengontrol negatif pertumbuhan yang dominan, gen p53 juga mempunyai peran aktif dalam mendeteksi kerusakan DNA dan menginduksi reparasi DNA serta *apoptosis*.

Defek pada gen Rb akan menyebabkan E2F dan DP1 selalu bebas dan akan terus menerus menggiring sel masuk dalam fase S, sehingga sintesis DNA dan pembelahan sel akan berlangsung terus-menerus (Cotran, 1999). Di samping mutasi pRb, dapat juga terjadi mutasi pada materi jasad lain yang berhubungan dengan pRb, misalnya kompleks siklin D/cdk4. Juga p15 dan p16 yang akan menghambat siklin D/cdk4. Akhir-akhir ini diduga juga bahwa pRb berhubungan dengan proses *apoptosis*.

Gen p53 adalah suatu gen supresor tumor yang dikenal sebagai "*master guardian of the genome*" dan merupakan unsur utama yang memelihara stabilitas genetik (Kief, 1996). Gen ini terletak pada lengan pendek kromosom 17 (p17). Gen ini menjalankan aktivitas pada 2 *checkpoints* penting dalam siklus sel yaitu pada fase G1 dan G2/M. Dalam keadaan normal p53 terdiri atas suatu tetramer. Ini berarti bahwa 4 copy yang identik dirakit untuk membentuk molekul p53 yang disandinya. Apabila satu sel mempunyai 1 *alel wild type* (normal) dan *alel* lainnya defek, maka fungsi menjadi kurang baik. Fungsi p53 akan berfungsi baik bila ke-4

subunitnya normal. Gen ini mengatur fungsi berbagai gen lain yang terlibat dalam respons pertumbuhan atau kematian sel dan perbaikan DNA akibat rangsangan genotoksik. Dengan demikian p53 melindungi sel agar tidak terjadi transformasi. Bagaimana ia mampu mengatur berbagai proses yang berbeda belum semua diketahui pasti. Diduga bahwa bentuk tetramer dari p53 mengakibatkan molekul ini dapat mengikat berbagai sekuens spesifik DNA. Hal ini dapat terjadi transaktivasi sekelompok gen tertentu yang prosesnya berlangsung melalui suatu *network* (King, 2000).

Fungsi gen p53 tidak terbatas pada perlindungan terhadap stress onkogenik. Fungsi lain yang lebih penting adalah dalam mendeteksi sintesis DNA yang salah atau kerusakan DNA dan mengatur kelangsungan perbaikan DNA. Salah satu mekanisme kerja p53 adalah menghentikan siklus sel pada fase G1 melalui *cell cycle inhibitor* p21. Dengan memberi kesempatan kepada gen-gen DNA *repair* memperbaiki DNA yang rusak, sebelum siklus sel berlanjut ke fase S untuk sintesis DNA. Adanya G1 *arrest* dimaksudkan untuk mencegah terjadinya sintesis dan replikasi DNA yang rusak. Fase S akan dilanjutkan apabila DNA yang rusak selesai diperbaiki. Dapat dimengerti bahwa mutasi p53 menyebabkan disfungsi p53 dan dapat berakibat siklus sel tidak berhenti pada fase G1 tetapi berlanjut ke fase S dan G2/M. Hal ini berakibat DNA yang mengalami kerusakan tetap dilipat gandakan. Sel yang mengandung

DNA rusak tetap mitosis menghasilkan populasi sel mengandung DNA abnormal (Kastan, 1997).

Mutasi gen p53 yang dapat berupa delesi luas atau hanya *point mutation*, akan mengubah sifat onkoprotein yang diproduksinya, sehingga menghilangkan kemampuan protein p53 baik sebagai materi anti proliferasi, maupun sebagai pengatur proses apoptosis pada kerusakan DNA. Gen p53 bekerja pada posisi yang bertentangan dengan onkogen c-myc. Berarti p53 sebagai supresor sedangkan c-myc sebagai faktor transkripsi. Peningkatan ekspresi c-myc atau inaktivasi p53 akan mengakibatkan sel berproliferasi secara berlebihan. Di samping itu juga inaktivasi gen p53 dapat terjadi bila berikatan dengan protein mdm2, atau karena adanya infeksi virus misalnya HPV melalui pengikatan dengan protein HPV E6, EBV (Gondhowiardjo, 1998).

2.3 Implikasi Kelainan Siklus Sel terhadap Keganasan

Sel kanker dapat mempunyai abnormal fenotipe yang beragam antara lain diferensiasi, peningkatan motalitas, tingkat invasi, perbedaan dalam sensitivitas terhadap obat. Walaupun beragam fenotip yang terjadi namun penyebab utama adalah disregulasi kontrol terhadap siklus sel Hal ini karena terjadi mekanisme kontrol yang tidak bekerja dengan baik. Keadaan ini menyebabkan sel akan berkembang tanpa mekanisme kontrol

seperti yang terjadi pada sel normal. Transformasi ini tergantung pada mutasi gen mekanisme kontrol siklus sel tersebut. Keganasan pada umumnya dapat terjadi melalui tiga mekanisme, yaitu pertama perpendekan waktu siklus sel, sehingga akan menghasilkan lebih banyak sel yang diproduksi dalam satuan waktu. Kedua penurunan jumlah kematian sel akibat gangguan pada proses *apoptosis* atau nekrosis. Gabungan mutasi pada berbagai proto-onkogen yang merangsang sel menjalani siklus sel dan gen supresor tumor (TSGs) yang menghambat penghentian proses siklus. Kerusakan mekanisme kontrol terhadap *apoptosis* yang mencegah *apoptosis* sebagai contoh ekspresi berlebihan *bcl2*, penurunan ekspresi *Bax*, dan mutasi *p53*. Perubahan mekanisme ini menyebabkan gangguan diferensiasi sel sehingga terjadi perubahan pola proliferasi sel yang akhirnya menjadi keganasan. Kemungkinan lain terjadi pertumbuhan tidak terkontrol bila terjadi mutasi proto-onkogen. Salah satu adalah terjadi mutasi proto-onkogen yang menyandi produksi GF, antara lain *c-sis* (Cantley, 1991). Hal ini mengakibatkan GF akan diproduksi terus menerus dan merangsang untuk berproliferasi. Keadaan lain adalah bila terjadi translokasi *c-myc* antara kromosom 8 dan 14 maka *c-myc* akan aktif tanpa kontrol merangsang terus terjadi transkripsi. Hal ini mengakibatkan terjadi pembelahan sel yang berlebihan sehingga proliferasi tidak terkontrol dan akhirnya terbentuk neoplasma.

Kemungkinan lain penyebab terjadi proliferasi tidak terkontrol adalah proto-onkogen yang menyandi produksi GFR mengalami mutasi. Gen tersebut antara lain Her2/neu, c-fms. Akibat dari mutasi gen tersebut adalah produksi GFR menjadi berlebihan, sehingga sel tersebut sangat sensitif terhadap GF. Pada keadaan terdapat ekspresi GFR yang berlebihan tersebut akan berakibat terjadi proliferasi yang berlebihan. Hal ini akan diturunkan juga pada sel anak sehingga terbentuk klon dengan mutasi gen yang identik pada sel. Walaupun telah terbentuk klonal yang identik tersebut namun pertumbuhan tumor masih tergantung pada berbagai faktor lain. Seperti gen yang mengatur baik *repair* gen maupun apoptosis. Apabila gen tersebut bekerja dengan baik mekanisme tersebut dapat diperbaiki atau dihentikan sehingga pertumbuhan tumor dapat dicegah.

Kemungkinan lain proto-onkogen yang termutasi adalah protein, yang disandi gen c-rsc, ras. Ekspresi protein ini tidak memerlukan rangsangan dari luar. Sel akan berproliferasi tanpa memerlukan stimulus dari luar. Hal ini menyebabkan sulit dihentikan walau dengan menghambat faktor ekstraseluler. Diduga pengangkatan seluruh massa tumor akan menghentikan pertumbuhan selanjutnya. Kemungkinan lain penyebab perubahan mekanisme proliferasi sel adalah gangguan pada sinyal kompleks siklin dengan *cdk* terhadap siklus sel. Bila terjadi ekspresi berlebihan

sikin akan menyebabkan pembetahan sel yang berlebihan sehingga proliferasi sel tidak terkendali.

Dan berbagai contoh perubahan mekanisme proliferasi di atas maka semakin jelas bahwa sifat biologik tumor berbeda. Hal ini diduga yang menyebabkan gambaran klinis dan respons tumor terhadap terapi juga berbeda satu dengan yang lain. Pengetian dan penemuan tentang jasad mekanisme proliferasi pada suatu tumor memungkinkan dibuat suatu strategi pengobatan baru yang lebih efektif bagi tumor bersangkutan. Tumor yang tumbuh oleh karena disebabkan perubahan mekanisme proliferasi yang tidak terlalu kompleks diduga akan lebih mudah diatasi dibandingkan tumor yang tumbuh melalui perubahan mekanisme yang multifaktor

Selain *cellular oncogenes* seperti yang telah diuraikan di atas, dikenal juga onkogen virus yang terdapat dalam materi genetik. Bahkan beberapa jenis onkogen virus ini merupakan onkogen pertama yang ditemukan pada kanker. Sifat dan strukturnya homolog dengan onkogen yang terdapat pada manusia sehingga keberadaan onkogen virus ini dalam sel manusia dianggap sebagai salah satu faktor penyebab/pencetus terjadinya kanker (Israel, 1996).

2.4 Peranan Virus dalam Karsinogenesis

Gen adalah unit kerja dari DNA. DNA adalah data dasar informasi dalam bentuk kimiawi, yang membawa seperangkat instruksi untuk membentuk protein yang diperlukan sel. DNA berbentuk untai spiral ganda yang membawa satu set lengkap instruksi. Setiap untai tersusun atas jutaan basa. Ada 4 basa di dalam DNA, yaitu Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) dan Guanin (G), namun susunannya amat bervariasi. Agar sel dapat membuat protein, informasi dari gen dikopi, digandakan, persis sama dari basa satu ke basa berikut. Dari DNA ke *messenger RNA* (mRNA). Kemudian mRNA berpindah keluar inti, masuk ke sitoplasma, ke dalam organel yang disebut ribosom, mRNA mengatur pembentukan asam amino, dan menyusun menjadi molekul protein (Kusick, VA, 1989).

DNA terletak di dalam setiap inti sel. Setiap sel manusia (ada triliunan sel) mengandung DNA yang sama. Setiap sel mempunyai 46 kromosom. Setiap kromosom mengandung banyak gen. Satu gen adalah satu segmen, satu bagian dari DNA berisi instruksi yang membantu sel memproduksi protein, misalnya enzim. Walaupun setiap sel mempunyai DNA yang lengkap, namun setiap sel memanfaatkan gen tersebut secara selektif. Gen yang lain, seringkali tidak aktif untuk waktu yang lama. Selain itu ada gen yang aktif pada waktu perkembangan embrio, kemudian setelah itu menjadi tidak

aktif. Banyak gen yang berfungsi untuk membentuk protein khas untuk sel tertentu, dan memberikan karakter yang spesifik untuk sel tersebut. Sebagai contoh sel otak mempunyai spesifikasi yang berbeda dari sel tulang. Sel normal akan mengaktifasi berbagai gen yang diperlukan saja, pada waktu tertentu. Keadaan ini akan menekan aktivitas gen lain yang tidak diperlukan (Kusick, VA, 1989).

Meskipun kanker dipicu oleh kelainan genetik, namun tidak semua diturunkan. Terjadinya kanker dapat berasal dari berbagai mutasi. Mutasi ini dapat terjadi akibat kesalahan sewaktu pembelahan sel. Selain itu mutasi dapat terjadi akibat respons terhadap kerusakan yang ditimbulkan oleh faktor lingkungan, seperti zat kimia radiasi dan virus (Cotran, 1998).

Onkogen ditemukan pertama kali ketika para peneliti sedang menyelidiki virus RNA (retrovirus) sebagai penyebab sarcoma (Fearon, 1995). Virus itu kemudian dinamai dengan *Rous Sarcoma Virus* dan onkogenya disebut *v-src*. Berdasar laporan Willie (1998) gen penyebab kanker pada percobaan binatang hampir 100% sama dengan gen yang terdapat pada manusia. Diduga onkogen virus terjadi sejak dahulu kala yaitu ketika virus tersebut masuk ke dalam materi genetik sel manusia. Bentuk onkogen dalam virus disebut sebagai *v-onc*, sedangkan onkogen homolog di dalam sel manusia disebut *c-onc*. Virus merupakan salah satu faktor yang dapat mengaktifasi onkogen agar terus menerus membentuk protein yang

diperlukan untuk pertumbuhan sel. Hal ini yang menyebabkan terjadi proliferasi sel berlebihan sehingga menjadi kanker. Tabel 2.1 menunjukkan beberapa jenis virus yang bertubungan dengan proses karsinogenesis (King, 2000).

Tabel 2.1 Beberapa virus penyebab kanker (Fearon, 1995)

Kelas	Jenis
Virus DNA	
Papovavirus	Polymavirus, SV40, HPV
Adenovirus	Adenovirus 12, 18 dan 31
Herpesvirus	Virus Epstein-Barr
Hepadnavirus	Virus Hepatitis B
Virus RNA	
Retrovirus tipe C	virus murine sarcoma dan leukemia,
Retrovirus tipe B	virus avian sarcoma dan leukemia, virus human T cell leukemia I dan II mammary tumor virus.

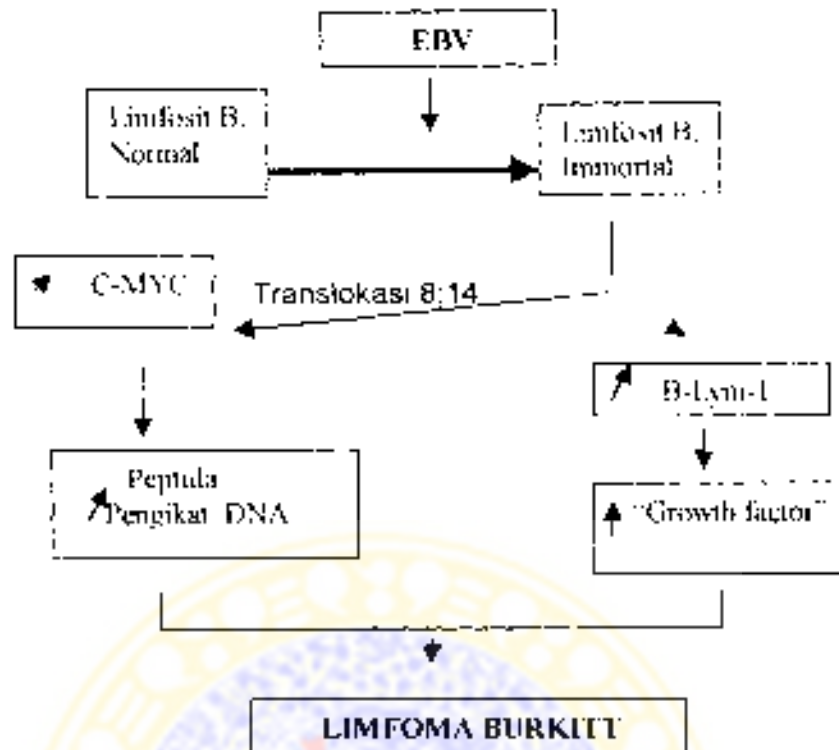
Untuk lebih bisa memahami mekanisme terjadinya kanker yang disebabkan oleh virus maka dapat dilihat pada kasus limfoma Burkitt. Kanker ini disebabkan oleh onkogen virus. Virus yang berperan adalah Epstein-Barr. Contoh lain adalah kanker serviks yang disebabkan oleh virus Papiloma. Pada keadaan ini onkogen virus dibawa oleh virus dan ditransport ke dalam sel target. Onkogen virus tersebut akan masuk dan ada di dalam inti sel tersebut. Keadaan ini menyebabkan terjadi perubahan gen di dalam inti sel

tersebut. Selain itu akan direplikasi bersama dengan pembelahan sel. Turunan dari sel target tersebut tetap mengandung gen virus. Hal ini penting untuk memelihara agar virus tersebut tetap hidup di dalam sel. Keadaan ini menyebabkan sel tetap ada pada kondisi abnormal.

Pada keadaan fisiologis proses pertumbuhan, pembelahan dan diferensiasi sel diatur oleh gen yang disebut protoonkogen. Protoonkogen dapat menjadi onkogen bila mengalami mutasi. Onkogen dapat menyebabkan kanker karena memicu pertumbuhan dan pembelahan sel secara patologis.

Terdapat 5 mekanisme yang dapat mengubah ekspresi atau struktur protoonkogen sehingga menjadi onkogen, yaitu (1) *deletion in coding sequens*, (2) *point mutation in coding sequens*, (3) *gene amplification*, (4) *chromosome rearrangement* (Haryana.SM, 2002). Tiga mekanisme yang pertama menyebabkan transkripsi meningkat sehingga terjadi peningkatan jumlah protein yang dihasilkan oleh onkogen tetapi struktur dari protein itu sendiri tidak berubah. Pada mekanisme yang keempat menyebabkan perubahan struktur protein yang dihasilkan oleh onkogen. Artinya peningkatan jumlah ekspresi atau perubahan struktur protein yang merupakan produk dari suatu onkogen dapat menyebabkan sel tumbuh dan membelah secara tidak terkendali.

Sebuah onkogen yang dipunyai oleh sel target akibat mutasi atau akibat infeksi virus tidak cukup mengubah sel target menjadi sel kanker. Tampaknya, sel tumor mengandung perubahan genetik *multiple* yang bekerja sama membentuk pertumbuhan neoplasma. Peristiwa tersebut mungkin dapat menerangkan karsinogenesis bertahap (*multistep carcinogenesis*) yang sudah lama dianggap sebagai patofisiologi timbulnya kanker (Putra S.T, 1997). Tiap tahap dibatasi dengan mutasi genetik. Sebagai contoh adalah papiloma (prekanker) mengandung onkogen ras. Perubahan dari papiloma menjadi kanker tergantung dari perubahan genetik yang kedua. Contoh serupa adalah perubahan dari polip usus besar menjadi kanker. Pada kanker ini diawali dengan gen mutasi yang merupakan supresor tumor. Tahap selanjutnya dipengaruhi oleh onkogen K-ras, mutasi pada gen DCC yang mengakibatkan berkembang menjadi adenoma. Selain itu dipengaruhi oleh gen supresor tumor p53 menyebabkan perubahan menjadi karsinoma (Mendelison J, 1995). Berikut salah satu contoh kanker yang disebabkan oleh virus EBV yaitu limfoma Burkitt (Gordon, 1985).



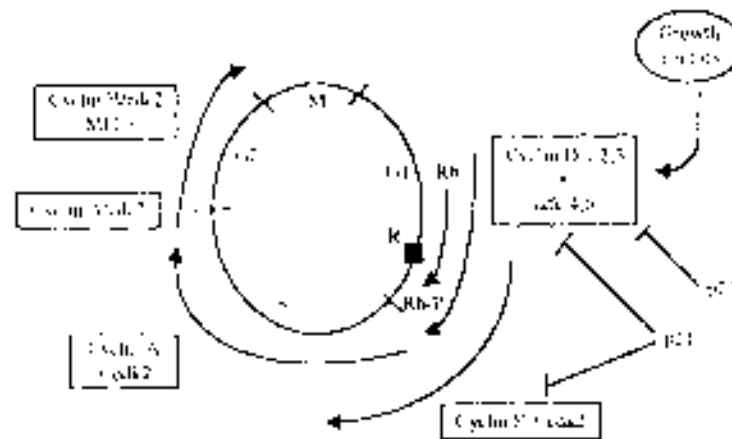
Gambar 2.1 Interaksi antara virus Epstein-Barr, onkogen c-myc dan B-lym dalam patogenesis Limfoma Burkitt (Gordon, 1985)

2.5 Aktivitas Gen Suppressor p53

Sel mamalia menunjukkan respons yang kompleks terhadap berbagai proses yang merusak DNA. Respons ini dimungkinkan karena sel itu memiliki gen yang mempunyai fungsi protektif, yaitu yang dikenal sebagai *DNA-damage inducible genes* (DDI gen). Termasuk dalam kelompok gen ini adalah gen yang produknya mempunyai fungsi penting dalam DNA-repair (*repair related function*) atau mengaktifasi *cell cycle checkpoint*. *Cell cycle checkpoints* berfungsi memperpanjang waktu tertentu dalam siklus sel untuk

memberi kesempatan perbaikan DNA yang rusak (*DNA repair*) sebelum diipat gandakan.

Siklus sel terdiri dari fase G1 yaitu periode antara pembelahan nukleus sebelumnya dengan permulaan sintesis DNA. Fase S adalah periode sintesis DNA pada saat itu terjadi replikasi DNA. Fase G2 ialah periode antara replikasi DNA dan pembelahan nucleus. Fase M adalah fase mitosis atau pembelahan sel. Setiap fase dalam siklus sel ini dikendalikan secara ketat dan waktu yang diperlukan bagi setiap fase selalu tetap. Di tingkat molekuler semua proses yang terjadi dalam siklus sel dikendalikan oleh pembentukan dan aktivitas sejumlah kompleks protein kinase yang terdiri atas sub-unit disebut *cyclin dependent kinase (Cdk)* dan sub-unit protein regulator yang disebut *cyclin*. Pada tahap tertentu dalam siklus sel, kompleks *cyclin-Cdk* diaktifkan. Setelah membentuk kompleks akan memfosforilasi molekul-molekul tertentu. Dari berbagai penelitian terungkap bahwa ada 2 gen dengan produknya yang mempunyai fungsi penting dalam *cell cycle checkpoints*, yaitu *rb* dan *p53*. Selain itu terdapat beberapa produk gen lain yaitu sebagai faktor transkripsi (*transcriptional regulators*), gen yang menghambat *Cdk* dan yang berfungsi terhadap alur sinyal transduksi (Lee, 1993; King, 2000).



Gambar 2.2 Berbagai siklus pengatur siklus sel (Kastan, BM, 1997)

Dahulu diduga bahwa p53 merupakan suatu onkogen karena ia ditemukan secara berlebihan dalam sel yang mengalami transformasi. Dugaan ini muncul karena pada beberapa penelitian telah diisolasi beberapa klon p53 yang terbukti mampu mempertahankan sel dalam kultur hidup terus (*imortal*). Bekerja sama dengan onkogen ras, p53 meningkatkan terjadinya transformasi sel dalam kultur. Tetapi kemudian diketahui bahwa p53 yang terdapat dalam sel transformasi tersebut merupakan bentuk mutant dari p53. Dari penelitian berikutnya terungkap bahwa p53 normal (*wild type*) mampu menekan transformasi sel yang disebabkan onkogen dalam kultur dan dapat menghambat potensi tumorigenik sel pada binatang percobaan, maka p53 kemudian digolongkan sebagai gen supresor (Schaller, 1997). Gen DNA p53, terdiri atas 11 exon dan diekspresikan pada hampir semua jaringan tubuh. Dalam keadaan normal p53 terdiri atas suatu tetramer

(CMGS, 1996); ini berarti bahwa 4 copy yang identik dirakit untuk membentuk molekul p53 yang aktif. Konsekuensinya adalah bahwa:

(1) defek pada salah satu di antara 4 subunit, misalnya akibat substitusi asam amino atau defek struktural, akan melemahkan fungsi protein p53.

(2) bila satu sel mempunyai 1 alel *wild type* dan alel yang lainnya defek, maka sebagian besar fungsi p53 akan terganggu.

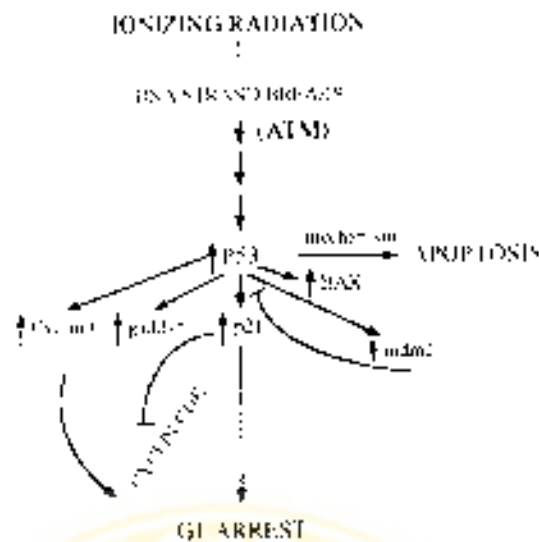
Hal ini berarti bahwa p53 hanya akan berfungsi baik bila ke-4 subunitnya normal. Hal ini berbeda dengan gen supresor yang lain, yang biasanya berada dalam bentuk molekul tunggal yang bebas. Pada umumnya defek pada p53 adalah *point mutation*, terutama substitusi asam amino. Walaupun unit yang lain dalam tetramer itu normal namun bila salah satu mutasi maka fungsinya akan terganggu, kemungkinan alel yang lain mengalami deleasi. Genom p53 dikenal sebagai gen dominan negatif. Selain akibat mutasi, disfungsi gen p53 juga dapat terjadi akibat pengikatan p53 oleh produk onkogen virus SV40-T, protein E1B adenovirus dan protein E6 HPV. Di samping itu p53 ternyata juga berinteraksi dengan protein 90 kd. Protein 90 kd adalah produk gen *mdm2* berupa fosfoprotein nuklear. *Mdm2* merupakan sasaran transkripsi bagi p53. Di lain pihak *Mdm2* juga dapat mengikat p53 pada domain transektivasi (Haiah, 2000). Interaksi ini akan mem-blok kemampuan p53 untuk mengaktifkan fungsi transkripsi dan mengontrol pertumbuhan sel.

Dengan demikian, interaksi antara p53 dengan mdm2 merupakan suatu bentuk *autoregulatory negative feedback loop*. Hambatan dalam interaksi p53-mdm2 mengakibatkan akumulasi p53 dengan fungsi transkripsi yang aktif. Hal ini menunjukkan bahwa dalam sel yang normal mdm2 diperlukan untuk mempertahankan agar ekspresi p53 tetap rendah.

Gen p53 menyandi protein dengan nama sama (P53) yang berfungsi sebagai aktivator transkripsi, yaitu menginduksi transkripsi gen yang menyandi protein 21 kd sehingga p21 berinteraksi dan menghambat berbagai kompleks *cyclin-cdk*. Di antara kompleks yang dihambat adalah kompleks yang mengandung cdk2 dan cdk4, yaitu kompleks kinase yang bertanggung jawab atas fosforilasi dan inaktivasi Rb. Dengan demikian, salah satu mekanisme kerja p53 dalam menghentikan siklus sel pada G1 adalah dengan mempertahankan Rb dalam bentuk konfigurasi *underphosphorylated*. Bila oleh karena suatu hal terjadi kerusakan DNA, ekspresi p53 dalam sel meningkat yang menyebabkan peningkatan transkripsi p21 serta hambatan pada kompleks *cyclin-cdk*. Telah terungkap juga bahwa p53 menghambat ekspresi atau fungsi gen *c-myc* dan *ras*. Pada *cell cycle checkpoint*, ketika p53 bekerja adalah pada fase G1 dan G2/M. Hal itu menyebabkan pertumbuhan sel terhenti pada fase G1 untuk memberi kesempatan pada gen DNA repair memperbaiki DNA sebelum siklus berlanjut ke fase S untuk sintesis DNA, atau

pada fase G2/M sebelum terjadi mitosis. Dengan demikian dapat dihindarkan terbentuk sel yang mengandung DNA yang rusak. Berdasar hal itu maka p53 disebut sebagai regulator negatif pertumbuhan dan pembelahan sel. Sel yang mengalami defek p53 tidak mampu menghentikan fase G1 maupun G2/M. Akibatnya adalah tidak ada kesempatan bagi gen DNA repair untuk memperbaiki DNA, sehingga DNA yang rusak diwariskan pada sel turunan. Hal ini menyebabkan ketidak stabilan genetik dan peningkatan mutagenesis, misalnya peningkatan *mutation rate*, amplifikasi onkogen, defek kromosom. Hal ini memungkinkan transformasi ganas menjadi lebih besar. Di samping memberikan respons terhadap kerusakan DNA, p53 sendiri mempunyai peran aktif dan mampu mendeteksi kerusakan DNA dan mampu menginduksi DNA repair.

Selain berfungsi menekan pertumbuhan sel yang mengalami transformasi, p53 juga berfungsi menginduksi atau meningkatkan apoptosis. Pada sel diperlukan ekspresi gen lain untuk membantu apoptosis, di antaranya bcl2 dan bax. Dari observasi itu jelas bahwa aktivasi p53 menghasilkan respons protektif seperti *cell arrest* dan *DNA repair* di satu pihak dan meningkatkan apoptosis sel-sel yang mengandung DNA yang rusak (Bratton, 2001).



Gambar 2.3 p53 check point pada G1 arrest (Kastan, BM, 1997)

2.6 Apoptosis

Apoptosis merupakan kematian sel yang terprogram sebagai respons terhadap rangsangan tertentu. Berbagai perubahan morfologi terjadi pada proses ini misalnya kondensasi dan fragmentasi nukleus, penciutan sel, juga fragmentasi DNA (Willie, 1998). Berbagai rangsangan misalnya radiasi, kemoterapi, infeksi virus, gangguan hormonal dan faktor pertumbuhan, dapat menyebabkan proses ini terjadi. Apoptosis juga merupakan hal penting dalam perkembangan sel normal dan homeostasis jaringan normal.

Berbagai gen pengatur proliferasi juga berperan dalam mengontrol apoptosis misalnya c-myc, p53, pRb (Lowe, 2000). Gen antiapoptotik bcl2 tampak meningkat pada limfoma. Bila terdapat

ekspresi berlebihan bcl2 dapat mencegah apoptosis dan terjadi keganasan.

Homeostasis jaringan tidak hanya bergantung pada pertumbuhan dan proliferasi sel tetapi juga pada perbandingan antara sel yang hidup dan sel yang mati. Dengan demikian perlumbuhan tumor juga bergantung pada peningkatan fraksi sel yang membelah diri dan fraksi sel yang mengalami kematian sel terprogram atau yang dikenal dengan istilah apoptosis. Tumor dengan fraksi kematian sel yang tinggi kelihatan tumbuh lambat walaupun fraksi pertumbuhan tinggi. Berbeda dengan kematian sel akibat hipoksia. Apoptosis adalah suatu proses fisiologis yang dikendalikan dengan kontrol genetik yang ketat, berlangsung melalui proteolisis, kondensasi dan fragmentasi DNA disusul dengan pengerutan sel. Secara biokimiawi terjadi aktivasi berbagai endonuklease dan protease, DNA dipecah menjadi fragmen-fragmen dengan panjang berbeda. Proses ini berakhir dengan di"makan"nya sel tersebut oleh sel yang ada di sekitar seperti makrofag, tanpa merangsang respons inflamasi.

Apoptosis merupakan proses penting baik dalam perkembangan jaringan normal maupun homeostasis jaringan pada orang dewasa. Sejak lama sudah diketahui bahwa untuk menyingkirkan sel T autoreaktif agar mencegah berlanjut menjadi penyakit autoimune atau untuk menyingkirkan sel limfosit T yang

terinfeksi HIV, baik di darah tepi maupun dalam kelenjar getah bening. Kematian sel terprogram juga merupakan proses penting dalam kelenjar getah bening. Kematian sel terprogram juga merupakan proses penting dalam perkembangan sel B, yaitu apabila terjadi kesalahan *rearrangement gen imunoglobulin* (Makin and Dive, 2001). Di dalam pusat germinal juga terjadi proses apoptosis yang tinggi untuk menyingkirkan sel-sel yang tidak diperlukan dan memilih sel-sel yang mempunyai afinitas tinggi terhadap antigen.

Dalam kaitan dengan pengendalian onkogenesis, apoptosis merupakan mekanisme penting untuk mencegah proliferasi sel yang mengalami kerusakan DNA, agar sel-sel dengan lesi DNA tersebut tidak dilipatgandakan. Dalam hal ini apoptosis berfungsi sebagai salah satu kontrol *checkpoint* dalam siklus sel. Kegagalan sel-sel tumor untuk melaksanakan mekanisme apoptosis merupakan salah satu faktor yang mendasari pertumbuhan tumor yang makin lama makin besar, instabilitas genetik sel bersangkutan dan resistensi terhadap kemoterapi. Defek mekanisme apoptosis dapat meningkatkan ketahanan hidup sel, menambah kemungkinan ekspansi sel ganas tanpa bergantung pada pembelahan sel. Akibat defek mekanisme apoptosis yang lain adalah kemungkinan terjadinya keganasan. Selain akibat instabilitas genetik dan akumulasi kelainan genetik, juga akibat perubahan terhadap aturan

yang ditentukan pada *checkpoint* siklus sel untuk menginduksi apoptosis

2.6.1 Jalur apoptosis dan berbagai molekul yang terlibat

Ada berbagai bukti yang menyatakan bahwa apoptosis, berhubungan dengan berbagai gen yang mengatur perkembangan sel. Kelainan pada aktivitas proliferasi sel juga berkaitan erat dengan kontrol apoptosis. Proses apoptosis dapat dibagi dalam tiga fase, yaitu fase inisiasi atau induksi heterogen yang bergantung pada stimulus. Fase efektor yang komitmen pada saat diambil keputusan untuk "bunuh diri". Fase degradasi atau eksekusi dimana sel bersangkutan memperlihatkan gambaran biokimia dan morfologi apoptosis. Selama fase induksi atau inisiasi yang heterogen, sel menerima stimulus yang menginduksi kematian yaitu kehilangan faktor penunjang ketahanan hidup, kekurangan suplai untuk metabolisme dan terjadi pengikatan reseptor yang meneruskan sinyal kematian misalnya pengikatan Fas/FasL, TNF/TNFR (Ashkenazi, 1998). Reaksi kimia yang berperan dalam fase induksi ini sangat heterogen bergantung pada seberapa letal stimulus yang diterima. Pada fase berikut, yaitu fase efektor, proses inisiasi dilanjutkan dengan reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur, dan sel mengambil keputusan atau komitmen untuk "bunuh diri". Pada fase selanjutnya, yaitu fase degradasi atau fase eksekusi,

terjadi peningkatan berbagai aktivitas, termasuk peningkatan aktivasi enzim-enzim katabolik dan produksi *reactive oxygen species (ROS)*. Pada fase ini terjadi perubahan morfologi dan biokimiawi sel, antara lain fragmentasi DNA, degradasi berbagai jenis protein dan lain-lain. Semua sel mengalami apoptosis menurut pola tertentu.

a. Faktor yang berperan pada fase inisiasi apoptosis

Berbagai stimulus dapat mengawali fase inisiasi melalui aktivasi berbagai transmembran. Contoh khas dari stimulasi ini adalah pengikatan Fas (CD95) yang merupakan protein homotrimerik dengan FasL, TNF dengan TNFR. (Kawasaki, *et al.*, 2002). Pada pengikatan Fas/FasL terjadi oligomerisasi dari reseptor yang mengakibatkan bagian intraseluler dari CD95 menggumpal dan dikenal dengan sebutan *death domain* atau FADD (*Fas associated death domain*). FADD merupakan molekul adaptor yang berperan merekrut *caspase*. Untuk mempermudah proses ini molekul FADD mengandung molekul pengikat yang disebut DEO (*death effector domain*) yang juga dimiliki oleh procaspase-8, sehingga keduanya dapat saling berikatan (Bratton and Cohen, 2001).

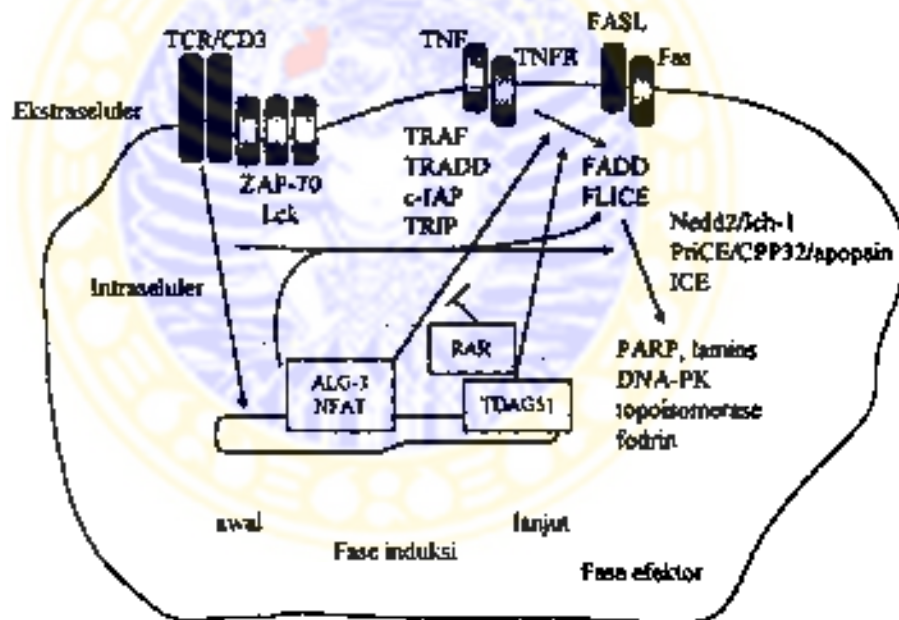
Fas (CD95), suatu reseptor pada permukaan sel yang berikatan dengan FasL (CD95L) merupakan awal dari sinyal apoptosis. Pada sekuens asam amino yang merupakan unsur-unsur *death effector, death effector domains*. Faktor-faktor lain yang berperan pada inisiasi apoptosis adalah reseptor TNF (TNFR),

CD27, CD30, CD40, DR3, DR4 dan DR5. Seperti halnya molekul CD95, molekul TNFR1, DR3, DR4 dan DR5 juga memiliki *death domain*, walaupun masing-masing meneruskan sinyal apoptosis melalui jalur yang tidak sama. Beberapa penelitian terakhir mengungkapkan bahwa pada saat berlangsung sinyal apoptosis melalui Fas, yang pertama terjadi adalah Fas-DISC (*Fas-death inducing signal*). Salah satu komponen Fas, yang pertama terbentuk setelah Fas-DISC adalah SADS (*small accelerator for death signaling*) yang fungsinya meningkatkan interaksi antara FADD dengan procaspase-8. Hambatan terhadap SADS memperlambat apoptosis.

Apoptosis juga dapat berlangsung melalui reseptor sel T (TCR). Hal ini terjadi apabila sel T mengenali antigen-diri (*self antigen*) dan merupakan suatu proses yang diperlukan untuk menyingkirkan sel T autoreaktif. Apoptosis ini disebut apoptosis yang diinduksi aktivasi (*activation induced apoptosis*). Jalur apoptosis melalui TCR diperlihatkan secara skematis pada gambar 2.4. Apoptosis yang diinduksi aktivasi ini juga terdiri atas fase induksi yang dirangsang dengan pengikatan TCR, disusul oleh fase efektor dimana terjadi berbagai reaksi biokimia untuk melangsungkan apoptosis.

Sinyal yang diberikan oleh TNF/TNFR mengatur interfase antara fase induksi awal yang mengatur ekspresi TNF/TNFR dengan

fase efektor yang melibatkan aktivasi caspase. ALG-3 dan NFAT merupakan regulator positif ekspresi FasL, selama apoptosis dengan perantara TCR/CD3, sedangkan RAR (*retinoic acid receptor*) yang menghambat proses ini. TNFR tidak mengandung death domain tetapi menggunakan protein TRAF dan TRIP. Fas mengandung death domain pada bagian intrasitoplasmik dan berintegrasi dengan molekul adaptor sinyal yang juga mengandung death domain (FADD) dengan demikian merekrut molekul transduksi sinyal misalnya FLICE. ZAP-70 dan Lck merupakan enzim kinase yang merupakan pengatur jalur sinyal melalui TCR.



Gambar 2.4 Fase induksi dan fase efektor apoptosis melalui TCR (Wong B and Choi, Y. 1997)

b. Faktor yang berperan pada fase efektor

Seperti telah disebut di atas, ada berbagai bukti bahwa pengendalian apoptosis ditubungkan dengan gen yang mengatur siklus sel, termasuk di antaranya gen p53, Rb, myc. Di lain pihak berbagai jenis gen berfungsi sebagai penghambat apoptosis, di antaranya keluarga bcl2 dan beberapa jenis onkogen virus yang dikenal memiliki potensi untuk mengakibatkan transformasi sel menjadi ganas.

Fungsi produk gen p53 dan Rb terkait erat dengan peristiwa dalam siklus sel pada fase G1. Mekanisme kerja p53 sangat kompleks Ia dapat berikatan dengan berbagai jenis protein dan terlibat dalam mengatur ekspresi berbagai gen. Dalam beberapa tahun terakhir terungkap bahwa p53 dapat mengatur proliferasi sel maupun apoptosis tergantung situasi dan latar belakang sel. Sel yang kehilangan p53 baik karena mutasi, infeksi virus atau sebab lain, mengakibatkan sel kehilangan kemampuan apoptosis kehilangan Rb, ekspresi c-myc dan anoksia. Di lain pihak, p53 yang *wild type* dapat mengkompensasi kehilangan Rb1 dengan demikian dapat mencegah terjadinya transformasi.

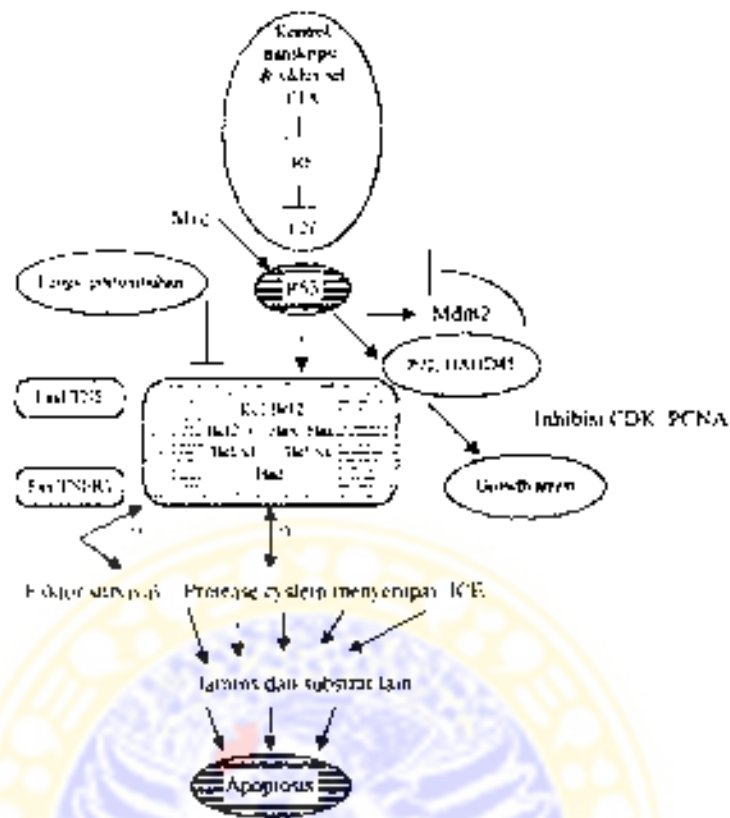
Gen retinoblastoma (Rb) mengatur berlangsungnya siklus sel pada fase G1/S dengan menghambat fungsi faktor transkripsi E2F dengan demikian menghambat fungsi berbagai gen yang bekerja pada fase S, termasuk di antaranya myc, myb dan DNA polimerase.

apoptotik yang kuat, ia tidak dapat menghambat semua bentuk apoptosis, salah satu contoh di antaranya adalah apoptosis yang diinduksi oleh TNF yang tidak dapat dihambat oleh bcl2. Gen bcl-2 ini termasuk keluarga gen yang anggota keluarganya makin lama makin bertambah; beberapa anggota keluarga gen ini bersifat menghambat apoptosis (bcl2, bcl-xl, mcl1), tetapi beberapa anggota keluarga yang lain ternyata bersifat memudahkan apoptosis (bax, bcl-xs, bad, bak) (Adams, 1998).

Sebagian besar keluarga protein bcl2 mengandung rantai asam amino hidrofobik pada sisi carboxy-terminal yang setelah ditranslasi mengakibatkan mereka dapat lekat pada membran biologis, khususnya membran mitokondria, envelop nukleus dan bagian dari retikulum endoplasmik. Ekspresi relatif anggota keluarga bcl2 yang pro-apoptotik dan anti-apoptotik menunjukkan bahwa suatu sel dengan mudah mengalami apoptosis bila dihadapkan pada stimulus yang tepat. Beberapa protein diekspresikan dengan pola spesifik jaringan yang bervariasi sesuai fase proliferasi dan diferensiasi yang unik untuk sel tertentu. Belum diketahui secara pasti bagaimana mekanisme bcl2 menghambat apoptosis, tetapi beberapa data terakhir menunjukkan bahwa bcl2 dan anggota keluarga lain yang anti-apoptotik, melangsungkan paling sedikit 2 aktivitas yang independen. Protein tersebut membentuk pori atau pore pada membran yang dilekati, dan berinteraksi dengan berbagai jenis

protein intraseluler lain yang secara langsung atau tidak langsung terlibat dalam proses apoptosis. *bcl2* dan *bcl-xl* diketahui dapat berinteraksi dengan berbagai protein, misalnya protein CED-4, Raf-1 (-kinase) dan *fosfatase calcineurin*. (King, 2000; Braton, 2001).

Interaksi ini menunjukkan bahwa salah satu peran *bcl2* adalah memberikan tempat bagi protein lain untuk "berlabuh" sehingga aktivitas seluler protein bersangkutan terhenti. Peristiwa ini menyebabkan protein CED-4 terperangkap atau *calcineurin* sehingga mereka tidak dapat berinteraksi dengan protein lain dalam sitosol. Peristiwa berlabuh protein, misalnya Raf-1, pada *bcl2* itu juga mengakibatkan protein tersebut melekat pada membran dan berinteraksi dengan protein membran yang lain. Raf-1 merupakan suatu enzim kinase, yang dalam keadaan normal terdapat dalam sitosol, berpindah tempat (translokasi) ke membran, menjadi aktif kemudian menginduksi fosforilasi protein pro-apoptotik Bad sehingga menjadi inaktif. Homolog gen *bcl2* yang bersifat anti-apoptotik juga terdapat pada virus herpes yang menyebabkan kanker, termasuk di antaranya virus Epstein Barr (EBV) dan virus sarkoma Kaposi (KSV).



Gambar 2.5 Peran p53 pada apoptosis (Perkins and Stem DF, 1997)

2.6.2 Disregulasi apoptosis pada kanker

Seperti telah diuraikan di atas banyak sekali faktor yang berperan dalam proses apoptosis. Sudah ditentua secara luas juga bahwa apoptosis merupakan salah satu cara untuk menyingkirkan sel yang mengandung lesi DNA, sehingga dapat dicegah terjadinya transformasi sel dan kanker. Kelainan atau mutasi yang terjadi pada berbagai gen, terutama gen yang berperan meningkatkan apoptosis, memungkinkan terjadinya resistensi terhadap proses apoptosis yang diperlukan untuk mencegah transformasi. Defek mekanisme

apoptosis berperan dalam menimbulkan kanker. Hal tersebut dengan cara menghasilkan lingkungan yang memungkinkan timbulnya instabilitas genetik dan akumulasi kelesinan gen. Keadaan tersebut yang menyebabkan *checkpoint* siklus sel tidak taat lagi pada pengendalian siklus sel yang dalam keadaan normal menginduksi terjadinya apoptosis, dan peningkatan ketahanan hidup sel (Reed JC, 1999).

Beberapa jenis keganasan hematologik menunjukkan resistensi terhadap stimulasi Fas/FasL. Salah satu di antaranya adalah leukemia mielositik kronik (CML). Diketahui bahwa pada sebagian besar CML terjadi fusi antara gen *bcr* dengan *c-abl* yang menghasilkan protein BCR-ABL. Protein abnormal ini terbukti dapat meningkatkan ketahanan hidup sel; salah satu caranya adalah melalui resistensi terhadap stimulasi apoptotik oleh Fas/FasL (Selleri C, et al, 1998).

Peran *bcl2* dalam onkogenesis, seperti telah disinggung yaitu melalui: 1) pencegahan dikeluarkannya *cytochrome-c* dari mitokondria dan 2) gangguan aktivasi *caspase* oleh *cytochrome-c* dan Apaf-1. Diduga bahwa ekspresi berlebihan *bcl2* dan *bcl-xl* dapat meningkatkan kedua proses di atas dan meningkatkan kemungkinan terjadinya transformasi (Green DR, 1998). Ekspresi berlebihan *bcl2* dan *bcl-xl* dijumpai pada berbagai jenis kanker. Ekspresi berlebihan gen ini dapat terjadi akibat translokasi (Suzuki A, et al, 2001; Tan X and

Wang JYJ, 1998) seperti yang dijumpai pada limfoma sel B. Seperti halnya pada limfoma, diduga ekspresi berlebihan bcl2 pada keganasan disebabkan ketidakseimbangan faktor transkripsi dengan bcl-2 atau akibat mutasi gen bcl2. Mutasi gen bcl2 sering dijumpai substitusi basa pada segmen penyandi (*coding region*) yang mengatur fosforilasi. Akibat mutasi ini maka fosforilasi bcl2 terganggu dan sel resisten terhadap rangsangan apoptosis (Reed JC, 1997). Protein berbagai jenis virus memiliki sekuens yang homolog dengan bcl2 atau bcl-xl, misalnya p19-E1B dari adenovirus, p30 dari Baculovirus dan BHFR-1 dari virus Epstein Barr. Virus tersebut sering dihubungkan dengan kanker. Diduga protein virus tersebut mempunyai fungsi yang sama dengan bcl2 yaitu antapoptosis.

2.7 Virus

Virus bukan sel tetapi merupakan parasit yang menyerang sel dan tidak melakukan fungsinya di luar sel inang. Virus kecil, hanya dapat dilihat dengan mikroskop elektron (EM), begitu kecil sehingga beratus-ratus atau beribu-ribu partikel virus dapat menempati satu sel atau inti sel dari inang. Jadi satu sel beribu-ribu kali lebih besar dari satu virus (King, 2000). Tiap partikel virus terdiri dari satu atau beberapa molekul asam nukleat yang terikat erat menjadi suatu massa yang kompak yang dikelilingi oleh selubung protein. Beberapa macam virus juga memiliki pembungkus luar tambahan yang

mengandung lebih dari 100 gen. Beberapa virus onkogenik mengandung 4 atau 5 gen. Berapapun jumlah kode gen protein virus dibutuhkan untuk memasuki inang dan melakukan reproduksi. Sebaliknya sel memiliki kromosom yang selalu mengandung DNA sebagai bahan genetik. Masing-masing kromosom sel dapat menjalankan sebagian besar aktivitas sel. Bahkan sel bakteri yang paling sederhana mengandung kira-kira 20.000 gen. Sel manusia mengandung kira-kira 50.000 dan 100.000 gen.

Partikel-partikel virus tidak memiliki sitoplasma maupun organela dan tidak mempunyai sebagian besar molekul yang diperlukan untuk aktivitas kehidupan ketika mereka ada di luar sel. Partikel virus bersifat inert dan tidak menunjukkan sifat-sifat kehidupan oleh karena ada pembungkus protein dan membran luar, yang melindungi kromosom di dalamnya. Virus dapat beradaptasi dengan baik, tetap eksis dalam keadaan *dorman* di luar sel inang. Banyak virus dapat tetap *dorman* untuk jangka waktu yang sangat panjang dan dalam beberapa tahun tetap hidup. Suatu virus yang *dorman* mirip dengan inti sel minimal yang kehilangan sitoplasma. Dengan demikian dapat membawa instruksi berupa kode-kode dalam kromosom. Hanya dengan memasuki sel inang suatu virus dapat memiliki mesin metabolisme yang sangat diperlukan untuk replikasi. Bila suatu virus menginfeksi sel inang yang cocok dia merubah sitoplasma inang ke dalam suatu bentuk yang dapat

menghasilkan komponen untuk partikel virus tersebut. Dalam hal ini virus adalah parasit yang harus intraseluler.

Ada beberapa partikel virus aktif baru, yang dapat menyebabkan sel inang pecah, sehingga melepaskan pasangan virus yang baru. Beberapa virus lain dapat terlepas melalui membran sel tanpa memecahkan sel. Virus baru dapat berada pada sel lain dari jenis yang sama. Virus akan memproduksi berjuta-juta partikel virus melalui jaringan atau organisme, merusak atau membunuh sejumlah sel pada setiap siklus. Setiap virus patogen menyerang dan merusak atau membunuh berbagai sel. Sebagai contoh, virus polio menyerang dan merusak berbagai macam sel, meliputi sel-sel epitel pada tenggorokan dan usus, sel-sel dari tonsil susunan saraf pusat (SSP). Sebagian besar kerusakan jaringan oleh karena virus polio yang menyebabkan penghentian G1 adalah reversibel. Dengan demikian sel-sel yang hilang dapat diganti oleh pembelahan sel yang telah diperbaharui. Bila virus polio menyerang dan menghancurkan kemudian berhenti secara permanen pada periode G1 siklus sel. Sel-sel saraf tak dapat membelah atau menggantikan sel saraf yang telah terbunuh tadi. Selain itu tidak ada sel lain yang membelah untuk membentuk pergantian sel-sel saraf. Virus jenis lain akan menyerang jaringan berbeda. Virus hepatitis merusak dan membunuh sel-sel hati. Beberapa macam virus usus yang berbeda merusak atau menghancurkan sel traktus intestinalis. Virus mampu

menginvasi sel-sel dari kelenjar liur dan kadang-kadang organ lain seperti pankreas dan testis. Beberapa dapat tetap dorman di dalam inang selama periode waktu lama tanpa gangguan. Sesudah beberapa bulan atau tahun, mereka dapat diaktifkan dan mulai menjadi multiplikasi. Virus herpes simplex merupakan suatu virus yang umum pada kulit manusia, selama periode yang panjang dalam keadaan dorman tidak berbahaya. Bila diaktifkan biasanya dengan cahaya ultraviolet atau dengan beberapa stress fisiologik terhadap inang organisme, virus ini bermultiplikasi, membunuh kelompok-kelompok sel lokal, membentuk lesi-lesi yang disebut *cold sores* atau *fever blisters* dan *cancer sores*.

2.7.1 Epstein-Barr Virus (EBV)

Epstein-Barr Virus (EBV) merupakan herpesvirus gamma yang termasuk dalam famili Herpesviridae dengan besar genom 172 kb, dari seluruh gen yang ada, 9 gen diantaranya diekspresikan dalam limfosit B yang terinfeksi. Virus ini merupakan virus DNA yang diselubungi oleh protein dan nukleokapsid yang terdiri dari 162 kapsomer. Genom DNA berupa untai ganda berbentuk linier atau dalam bentuk episom pada keadaan laten.

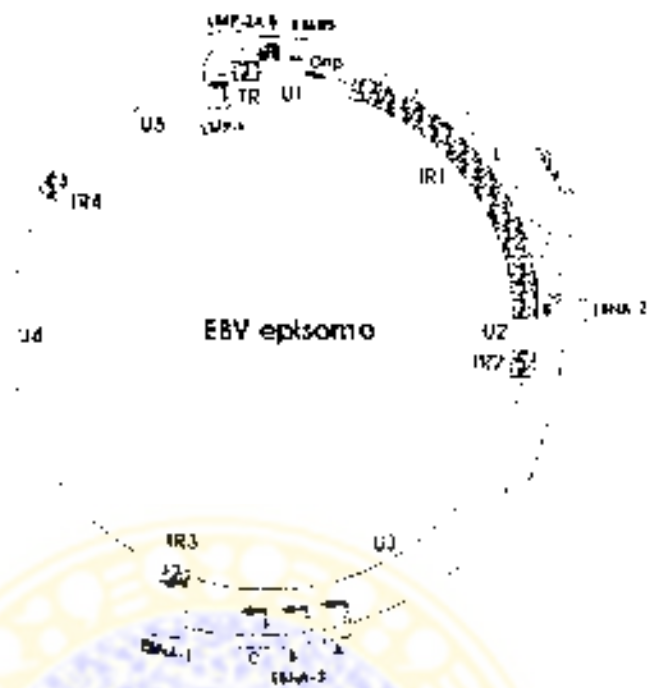
Kanker adalah penyakit genetik, kerusakan genetik ini dapat disebabkan oleh berbagai faktor antara lain bahan kimia, agen fisik dan agen biologik. Salah satu agen biologik adalah virus disebut

onkogen virus. Onkogen virus ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu DNA *onkogenic viruses* dan RNA *oncogenic viruses*. Ada 3 (tiga) DNA virus yang mempunyai peranan terhadap karsinogenesis yaitu HPV, EBV dan HBV. Secara umum HPV banyak ditemukan pada papilloma baik kulit maupun *farynx*; kanker *cervical*, sedangkan EBV pada *Nasopharyngeal carcinoma* dan *Burkitt's lymphoma*. HBV banyak didapatkan pada *Hepatocellular carcinoma*. Kemampuan virus DNA dalam karsinogenesis dengan membentuk asosiasi yang stabil dengan genom sel inang, dimana virus DNA ini mempunyai gen pengkode protein yang dapat berikatan secara spesifik terhadap protein inang (biasanya produk dari *gen tumor supresor*) yang berperan terhadap pengaturan proliferasi sel (www.uwo.ca).

EBV kebanyakan ditemukan pada infeksi yang asimtomatik. Infeksi pertama EBV biasanya pada usia anak sekali terinfeksi manusia akan *carrier* dalam hidupnya (www.cancer.bham.ac.uk). Kemampuan biologi EBV diketahui dapat berinteraksi dengan limfoid B, virus ini juga dapat menginfeksi sel epitel, namun kontribusi terhadap transformasi keganasan pada tumor epitelial masih belum jelas. Kemampuan EBV terhadap pertumbuhan sel banyak ditemukan pada *Nasopharynx Ca*, selain itu juga didapatkan di tempat lain yaitu epitel gaster. Hasil penelitian dari Cancer Research UK Institute dilaporkan bahwa ada beberapa ekspresi gen pada epitel *Nasopharynx Ca* yaitu LMP1, LMP2, dan EBNA1, namun

bagaimana virus tersebut menyebabkan transformasi ganas pada sel epitel masih diteliti. Kemampuan EBV untuk replikasi di dalam sel epitel telah ditunjukkan secara *in vivo* pada *Hairy leukoplakia* (www.cancer.ac.uk). Beberapa peneliti menemukan bahwa R2 C36 reseptor EBV pada limfosit B atau CD 21 diekspresikan pada sel epitel. Dari laporan Higa et al (2002) pada kasus Karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi EBV di Okinawa ternyata 18 dari 33 kasus terjadi mutasi (G → T dan C → A). Mutasi ini diasosiasikan dengan perubahan asam amino Arg → Met dan Thr → Ala.

Epstein-Barr virus merupakan virus DNA utas ganda, meliputi hampir 100 *open reading frames* teridentifikasi (Baer et al., 1984). Genom virus berbentuk linier sebagai partikel virus, ada bentuk lain berupa episom sirkuler dalam nukleus sel yang terinfeksi (Aitken et al., 1994). Dalam sel hospes yang tumbuh terus menerus (*immortal*) karena terinfeksi EBV, seluruh genom EBV dipertahankan sebagai *multiple covalently closed circular episomes* (Aitken et al., 1994) yaitu sirkulasi genom EBV linier dengan jumlah salinan yang konstan. Episom EBV mempunyai tiga domain yang meliputi domain *unique* (U1, U2, U3, U4 dan U5), *internal repeat* (IR1, IR2, IR3 dan IR4) dan *terminal repeat* (TR) (Gambar 2.6) *Internal repeat* membagi genom menjadi domain *unique short* (US) dan domain *unique long* (UL) (Kieff, 1996)



Gambar 2.6 Peta genom episom *Epstein-Barr virus* pada infeksi laten (Kieff, 1996)

Selama infeksi laten, ekspresi genom terbatas pada gen laten, yaitu: dua RNA kecil nuklear (EBER1 dan EBER2), enam antigen nuklear EBV (EBNA1, EBNA2, EBNA3, EBNA4, EBNA6 dan EBNA-LP), dan dua *latent membrane protein* (LMP1 dan LMP2) (Kieff, 1996; Boulter *et al.*, 1996). Bagian yang mengkode eram antigen nuklear berdasarkan peta fragmen restriksi *Bam*HI adalah: EBNA1 dikode oleh exon dalam fragmen *Bam*HI-K, EBNA2 dikode exon dalam fragmen *Bam*HI-Y dan-H, *leader protein* (EBNA-LP) atau EBNA5 dikode oleh beberapa exon dalam *repeat Bam*HI-W dan fragmen *Bam*HI-Y, sisanya 3 EBNA (EBNA3, -4 dan -6) berasal dari

suatu famili gen terkait, dikode dalam fragmen BamHI-E (Rowe *et al.*, 1989).

Infeksi EBV secara alami pada manusia terjadi di seluruh dunia dan menginfeksi lebih dari 90% populasi (Boulter *et al.*, 1996). *Epstein-Barr virus* merupakan herpesvirus limfotropik yang pada umumnya terdapat dalam limfosit setelah infeksi primer (Hu L.F, 1996), tetapi juga menginfeksi dan bereplikasi dalam sel-sel epitel orofaring. Antigen EBV merupakan gen penyebab mononukleosis infeksiosa (IM) dan penyakit limfoproliferatif pada pasien immunosupresi. Virus tersebut terkait erat dengan kejadian dua jenis kanker pada manusia, yaitu limfoma Burkitt (BL) dan karsinoma nasofaring (NPC) (Pathmanathan and Raab Kraub, *cit.*, Chong and Tsao, 1997) yang mempunyai distribusi geografis karakteristik (Wijayanti, 1999). Infeksi primer EBV umumnya bersifat asimtomatik, terjadi pada masa kanak-kanak dan diikuti oleh infeksi laten sepanjang hidupnya. Selama virus ada dalam sel B perifer, manifestasi klinik sering sebagai IM. Transmisi EBV terjadi melalui pertukaran saliva (Babcock and Lawson, 1999). Pada individu asimtomatis, virus tersebut dapat dideteksi dalam kumuran orofaring (Boulter *et al.*, 1996).

EBV menetap secara laten pada sel-sel epitel normal kelenjar ludah yang suatu saat dapat menjadi reaktif. Meskipun demikian dilaporkan namun letak latensi masih belum jelas. Deteksi reseptor

EBV pada lapisan basal dan intermediet dari membrana epitelia orofaring dan nasofaring menimbulkan hipotesis bahwa sel-sel epitelia merupakan tempat infeksi persisten, dan dalam sirkulasi darah selalu ada sel B yang terinfeksi (Babcock *et al.*, 1999). Fase laten EBV dalam sel basal berganti menjadi keadaan litik replikatif dan berkembang ke lapisan terluar. Virus secara kontinyu diproduksi dan dibebaskan ke dalam jaringan orofaring, sebagai tempat penyimpanan reinfeksi sel B sehingga ketika sel B bermigrasi ke perifer akan dikenali dan dieliminasi oleh sel T sitotoksik (Babcock *et al.*, 1999). Hal ini menunjukkan bahwa *B cell pool* merupakan tempat infeksi persisten. Penelitian secara imunofenotiping dan lokalisasi sel terinfeksi EBV dalam jaringan orofaring dan nasofaring menunjukkan bahwa infeksi litik dalam jaringan normal terjadi di limfosit dan tidak di sel epitel (Cruz, 1999).

Infeksi EBV pada *resting B cell in vitro* akan menyebabkan transformasi limfosit B menjadi *lymphoblastoid cell lines (LCLs) immortal*. Setiap sel LCL membawa sejumlah banyak salinan genom viral dan hanya mengekspresikan sebagian gen laten viral. Infeksi EBV *in vivo* pada limfosit B menyebabkan limfosit B mampu tumbuh cepat secara spontan dan berproliferasi tidak terbatas ketika dikultur. Setelah infeksi primer, EBV akan dipertahankan selama hidup sebagai infeksi persisten dalam jumlah relatif kecil pada limfosit B. Limfosit B yang menjadi laten kira-kira 1 setiap 10^6 sel B dan dapat

dideteksi dalam sirkulasi darah perifer karier sehat asimtomatik (Babcock, *et al.*, 1998).

Keberadaan EBV yang laten di dalam sel inang, didukung oleh keadaan EBV yang memproduksi gen laten antara lain RNA-EBV (EBER), EBV Nuclear Antigen (EBNA) dan Latent Membrane Protein (LMP). EBER ini walaupun sangat kecil namun dapat dilipat gandakan sebanyak $10^5 - 10^7$ setiap sel. Beberapa genom ini homolog dengan tRNA. EBER ini lokasi di inti dan menurut Middeldorp (2003) bahwa genom ini ternyata juga terkait dengan antigen La dan protein. Mempunyai peran terhadap transkripsi virus lain, termasuk pada EBNA dan LMP (Kieff E, 1996). Dilaporkan dapat pula menetralkan transkripsi yang secara normal dihambat oleh eIF-2 (Laing KG *et al.*, 1995). Selain itu sebagai perantara pencegah terjadinya apoptosis (Yamamoto, *et al.*, 2000) juga menghambat peran anti virus IFN α dan IFN δ serta menginduksi produksi IL-10 (Sharp, *et al.*, 1999).

EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) adalah protein inti yang terdiri dari amino terminus dan telah ditemukan bahwa struktur kristal EBNA-1 ini adalah domain dimer C-terminus yang terikat pada sekuens DNA. Dimer EBNA-1 mengikat DNA dengan sekuens TAG GAT AGC ATA – TGC TAC CCA GAT CCAG yang terdapat pada 3 (tiga) tempat di dalam genom EBV (Rawlins *et al.*, 1985). EBNA-1 adalah protein hanya diekspresikan oleh sel yang terinfeksi EBV

secara laten. Walaupun EBNA-1 adalah protein asing namun tidak dapat dibunuh oleh limfosit T sitotoksik. Hal ini karena peranan protein Gly-Ala akan diulang akibat ekspresi EBNA-1 itu. Keadaan ini akan menghambat presentasi MHC Class 1. Hal ini menyebabkan EBV dapat bertahan hidup di dalam sel. Peranan EBNA-1 yang lain adalah mengaktifkan replikasi DNA melalui E2F. Keadaan ini semakin memperkuat kemampuan EBV untuk tetap *survive* di dalam sel inang sehingga sel menjadi imortal.

Laten Membran Protein-1 (LMP-1) berasal dari *open reading frame* BNLF-1. Pada hasil riset *cell line* sel B yang terinfeksi EBV didapatkan proliferasi dalam jumlah banyak. Protein LMP-1 dikode oleh 3 ekson sebagai membran protein dengan N-hidrofilik dalam jumlah sedikit dan C-terminus dalam jumlah besar. LMP-1 ini di dalam membran sel berbentuk potongan kecil dan berikatan dengan berbagai macam vesikel membran intraseluler. Bagian dari LMP-1 ini yang disekresi oleh vesikel pada sel yang terinfeksi EBV dinamakan *exosome* (Dukers, *et al.*, 2000). Pada penelitian *cell line* yang terinfeksi EBV secara *in vitro* mempunyai ekspresi LMP-1 sama dengan yang ditemukan pada sel tumor yang terinfeksi EBV secara *in vivo*, hal ini yang mendasari bahwa pada tumor yang terinfeksi EBV mempunyai prognosis buruk (de Bruin PC, *et al.*, 1993). Selain itu juga menyebabkan transformasi sel B, menghambat apoptosis sel B dengan menginduksi bcl-2 (Hendersen, *et al.*, 1991). Ditambahkan

pula bahwa LMP-1 dapat meningkatkan IL-10. Pada penelitian secara *in vitro*, monosit yang ditransgenik LMP-1 menunjukkan terjadinya hiperplasia epidermis, hal ini kemungkinan karena mempengaruhi ekspresi gen yang berkaitan dengan karsinogenesis. LMP-1 dapat berinteraksi dengan protein *tumor necrosis factor* (TNFR) yang menyebabkan stimulasi dan proliferasi baik pada sel B maupun sel epitel (Liebowitz, 1998). LMP-1 berperan seperti CD40, dimana ligan CD40 berhubungan dengan perantara jalur sinyal transduksi NF- κ B dengan cara berikatan terhadap *TNFR-associated factor* (TRAF) khususnya TRAF1 dan TRAF3. Interaksi TRAF 1, 3 akan menyebabkan NF- κ B aktif dan menghasilkan perubahan morfologi dan ekspresi marker aktivasi sel seperti CD 23, CD 39, CD 40, CD 44, MHG II dan molekul adhesi LFA-1 dan ICAM-1 (Mehl A.M, *et al.*, 2001), LMP-1 juga menginduksi peningkatan sinyal jalur JAK-STAT dengan mengikat JAK3 kinase sebagai mediator sinyal TRAF 2 (Gires O, *et al.*, 1999).

2.8 Karsinoma Rongga Mulut

2.8.1 Mukosa rongga mulut

Rongga mulut dilapisi oleh membran mukosa yang berkesinambungan dengan kulit, pada bagian luar berbatasan dengan bibir dan bagian dalam dengan mukosa faringial. Epitel

mukosa rongga mulut meliputi bibir, vestibulum, gingiva, palatum, dasar mulut dan sebagian lidah (Schroeder, 1991).

Epitel mukosa rongga mulut terdiri dari berbagai lapisan yang saling berhubungan antara lain *stratum corneum*, *stratum granulosum*, *stratum basale*. *Stratum basale* menempatkan diri pada lamina basalis yang membagi epitel dari jaringan ikat di bawahnya. Sel basal aktif membelah dan mengganti sel epitel dengan yang baru.

Kanker merupakan istilah untuk menyatakan neoplasma ganas. Neoplasma adalah pertumbuhan baru abnormal, tidak terkendali dan tetap berkembang walaupun penyebabnya telah dihilangkan. Tumor adalah istilah untuk menyebut benjolan (neoplasma). Oleh karena itu neoplasma ganas dapat disebut juga tumor ganas atau kanker. Kanker menurut morfologi seluler mempunyai karakteristik sebagai berikut: Anaplasia, pertumbuhan cepat, invasi ke jaringan sekitar dan metastasis (Cotran, et al., 1999).

Tata nama pada kanker didasarkan pada sel parenkimnya. Sarkoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari jaringan mesenkimal atau turunannya. Karsinoma adalah neoplasma ganas yang berasal dari epitel, dan yang membentuk pola kelenjar.

2.8.2 Karsinoma sel skuamosa rongga mulut

Paling sedikit 95% kanker di rongga mulut (termasuk lidah) adalah karsinoma sel skuamosa (Cotran, *et al.*, 1999; Peters, 2002). walaupun secara mudah dapat diketahui namun kenyalan, sering didapatkan dalam keadaan lanjut (Cotran, *et al.*, 1999), serta banyak ditemukan pada usia antara 50-70 th (Cotran, *et al.*, 1999). Laporan Budhy (2001) frekuensi karsinoma sel skuamosa terbanyak pada daerah kelenjar saliva, diikuti lidah, predeleksi sex lebih banyak pada pria. Etiologi secara pasti pada KSSRM masih belum jelas namun diduga adalah keterkaitan dengan asap rokok, tembakau (dalam bentuk susur) marijuana, alkohol dan virus. Iritasi kronis pemakaian denture tidak menyebabkan kanker ini secara langsung, namun kemungkinan memberi kontribusi terhadap leukoplakia (Cotran, *et al.*, 1999). Di India kanker sel skuamosa rongga mulut adalah jenis yang paling banyak ditemukan dengan insiden rerata 27 per 100.000 (Peters, 2002). Di Taiwan karsinoma sel skuamosa rongga mulut banyak ditemukan pada orang dengan riwayat perokok, pengguna tembakau susur dan alkohol. Dari beberapa orang dengan riwayat alkohol tersebut ditemukan adanya mutasi p53 sebanyak 56,44%; sedangkan pada pengguna rokok dan tembakau 48,66% (Hsieh, 2001). Keterkaitan KSSRM dengan EBV pernah pula dilaporkan antara lain oleh Shimakage (2002) bahwa pada KSSRM yang dideteksi secara *immunofluorescence* ditemukan EBNA2 dan LMP1.

Higa, *et al.* (2002) melaporkan bahwa 39 orang dari 54 penderita KSSRM positif EBV dengan rincian 25 orang positif EBV type A, 6 orang EBV type B dan 8 orang gabungan type A dan B. Di dapatkan pula 33 orang dari KSSRM positif EBNA2 dengan keadaan mutasi pada 18 orang. Pada EBNA2 yang mutasi hanya ditemukan pada KSSRM-EBV type A saja.

Secara morfologi KSSRM ini dapat timbul di berbagai tempat di dalam rongga mulut, walaupun lokasi tersering adalah dasar mulut, lidah dan palatum durum. Pada tahap awal secara klinis nampak *raise* (meninggi), *firm* (mengeras), *pearly plaque* (plak keputihan) dengan batas tidak jelas, *roughened* (kasar) kemerahan pada bagian tengah akan membentuk daerah verukos dengan tepi mukosa yang tebal, hal ini sering sulit dibedakan dengan *erythroplakia* (Cotran, *et al.*, 1999). Pada tahap selanjutnya lesi ini membesar dan menjadi nekrosis membentuk ulser iregular. Pada pemeriksaan histopatologi kanker ini dimulai sebagai lesi insitu digambarkan terjadi *dysplasia* sel epitel, dan pada keadaan lebih lanjut didapatkan sel *anaplasia* (Cotran, *et al.*, 1999).

2.9 *In situ* Hybridization

2.9.1 Hibridisasi asam nukleat

Hibridisasi asam nukleat merupakan salah satu metoda yang sekarang digunakan secara luas dalam biologi molekuler. Metoda ini

merupakan metoda yang sangat peka untuk menganalisis maupun menentukan karakter suatu fragmen DNA. Metoda hibridisasi ini dapat diterapkan pada beberapa keperluan, mulai dari mencari informasi letak suatu fragmen DNA dalam genom, analisis transkripsi dan regulasinya, deteksi penyakit genetik dan sidik jari DNA.

Proses hibridisasi ini berdasarkan pada pembentukan dupleks antara dua untai asam nukleat yang komplementer. Ada beberapa macam hibridisasi:

- a. Hibridisasi Southern, lokalisasi sekuen tertentu dalam DNA genom biasanya dilakukan dengan teknik yang ditemukan oleh Southern (Sudjadi, 2002). Dalam hal ini DNA genom dipotong dengan enzim endonuklease restriksi, dan fragmen yang dihasilkan dipisahkan berdasarkan ukurannya dengan elektroforesis gel agarosa. DNA kemudian didenaturisi in situ dan dipindahkan dari gel ke membran nilon atau membran nitroselulosa. Posisi DNA dalam gel sama dengan posisinya pada membran. DNA yang menempel pada filter dihibridisasi dengan pelacak DNA berlabel radioaktif, dan autoradiografi digunakan untuk menentukan letak pita yang komplementer dengan pelacak.
- b. Hibridisasi Northern, merupakan modifikasi dari metoda Southern dengan target RNA yang telah dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa dengan menggunakan pelacak DNA berlabel.

- c. Hibridisasi dot, target asam nukleat (DNA atau RNA) disentuhkan pada membran dan keberadaan target dilacak dengan pelacak DNA atau RNA berlabel.
- d. Hibridisasi in situ, merupakan hibridisasi antara pelacak DNA atau RNA dengan target DNA atau RNA pada preparat sitologis.

2.9.2 Strategi hibridisasi

Prinsip kerja sistem ini adalah terjadinya pasangan secara tepat antara dua untai DNA yang komplementer. Cara hibridisasi asam nukleat secara garis besar dapat dilakukan sebagai berikut:

1. Pengikatan DNA untai tunggal (target) pada membran.
2. Penambahan DNA pelacak untai tunggal yang telah berlabel pada kondisi tertentu (suhu dan konsentrasi ion) supaya terjadi pasangan antara DNA target dan pelacak.
3. Pencucian untuk menghilangkan kelebihan pelacak yang tidak menempel pada DNA target yang spesifik.
4. Deteksi hibrid antara DNA target dan pelacak.

Hibridisasi asam nukleat ini mempunyai tiga unsur yang harus mendapat perhatian: DNA pelacak, DNA target dan deteksi signal. Secara umum langkah pertama yang diperlukan dalam proses hibridisasi DNA adalah denaturasi fragmen DNA sehingga DNA berubah menjadi untai tunggal. DNA itu kemudian dipindahkan pada membran nitroselulosa atau nilon dan dipanasi pada 80° C atau

disinari dengan ultraviolet sehingga DNA mengadakan ikatan dengan membran. Selanjutnya pelacak yang berupa DNA untai tunggal dengan urutan basa spesifik dan berlabel diberi kesempatan untuk mencari pasangannya dengan membentuk dupleks dengan target yang komplementer. Deteksi terjadinya dupleks ini dilakukan dengan memaparkan pada film sinar x untuk pelacak dengan label radioaktif atau dengan reaksi warna untuk pelacak non-radioaktif. Proses pembentukan dupleks antara target dan pelacak ditentukan oleh dua hal utama. Pertama dua fragmen yang membentuk dupleks harus mempunyai tingkat komplementasi yang tinggi. Artinya, untuk fragmen dengan susunan basa -AACGTTA- hanya akan berpasangan dengan fragmen dengan susunan -TTGCAAT-. Kedua, dupleks yang terbentuk harus stabil. Pada umumnya tingkat komplementasi dari dua sekuen tersebut dapat ditentukan secara mudah dengan mengukur stabilitas fragmen dupleks pada suhu yang semakin tinggi. Stabilitas dupleks pada dasarnya tergantung dari:

1. Jumlah basa yang komplementer. Semakin panjang jumlah basa yang komplementer, dupleks yang terbentuk semakin stabil.
2. Jenis basa yang komplementer. Jika yang komplementer itu mengandung banyak pasangan G dan C akan lebih stabil jika dibandingkan dengan yang banyak mengandung A dan T. Hal ini disebabkan G dan C membentuk tiga ikatan hidrogen sedangkan A dan T hanya membentuk dua ikatan hidrogen.

3. Kadar garam Komplementer yang terbentuk pada larutan kadar garam 0,5 M berarti stabil jika dibandingkan dengan komplementer yang pembentukannya hanya dapat terjadi pada kadar 0,1 M.
4. Suhu Secara umum suhu optimum hibridisasi untuk pelacak dengan panjang 200 nukleotida adalah 25°C di bawah suhu leleh (T_m). Pelacak dengan ukuran lebih pendek, harga T_m nya juga rendah, suhu hibndisasi pada $T_m - 25^\circ\text{C}$. Jika suhu dinaikkan maka hibrid tersebut dapat lepas. Suhu leleh DNA dapat dihitung berdasarkan persamaan Bolton dan McCarthy

$$T_m = 81,5 - 16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41(\%G + C) - (600N)$$
 N = panjang oligonukleotida

2.9.3 Pelacak

Supaya efektif, pelacak yang digunakan harus sangat spesifik urutan basanya. Dengan kata lain, pelacak harus hanya hibridisasi pada urutan asam nukleat target yang komplementer. Positif palsu (misalnya, ada respons pada sekuens target tidak ada) dan negatif palsu sangat mengganggu penggunaan suatu prosedur diagnosis. Pelacak dapat spesifik untuk membedakan organisme yang ada, membedakan spesies, menetapkan galur tertentu dalam suatu spesies, atau mengidentifikasi perbedaan antara gen. Pelacak ini dapat berupa suatu DNA atau RNA dengan panjang kurang dari 50

nukleotida (pendek) atau lebih dari 100 nukleotida (panjang). Pelacak dapat berasal dari sintesis kimial, gen yang diklon atau sebagian dari gen yang diekspresi.

Sekuens yang efektif untuk pelacak dapat diperoleh dengan beberapa cara. Misalnya, DNA dari organisme patogen dapat dipotong dengan enzim endonuklease dan diklon pada suatu plasmid. Plasmid rekombinan ditapis dengan DNA genom baik dari galur patogen dan non-patogen. Plasmid yang membawa DNA yang spesifik hanya hibridisasi dengan DNA patogen saja. Uji hibridisasi tambahan dengan DNA pelacak diuji dengan berbagai organisme untuk melihat apakah calon pelacak itu hibridisasi silang dengan DNA bukan target. Setiap calon pelacak harus diuji pada kondisi sampel, termasuk biakan yang tercampur, dan penetapan batas kepekaan.

Kemampuan pelacak untuk hibridisasi dengan DNA target tanpa pembiakan tambahan atau prosedur ekstraksi merupakan uji diagnosis yang diperlukan, terutama untuk sampel klinik. Jika sampel terdapat dalam jumlah sedikit dan sulit diperoleh dapat diamplifikasi dengan metode *Polymerase chain reaction (PCR)*.

2.9.4 Hibridisasi dengan radioaktif

Pada awalnya hibridisasi asam nukleat dengan menggunakan pelacak berlabel radioaktif ^{32}P . Aktivitas yang sangat spesifik menghasilkan *signal* yang sangat bagus.

Pada sistem deteksi yang baku, pelacak berlabel radioaktif dicampur dengan DNA target yang menempel pada membran. Setelah pencucian, tidak ada pelacak tersisa yang tidak berikatan dengan DNA target. Adanya pelacak yang menempel pada DNA target ditunjukkan dengan film sinar X (autoradiografi), seperti ditunjukkan pada Gambar 2.7.

Penggunaan nitroselulosa sebagai fasa pendukung hibridisasi bukan pilihan yang ideal. Pertama, asam nukleat menempel secara hidrofobik daripada ikatan kovalen sehingga dapat lepas secara perlahan-lahan dan matriksnya selama hibridisasi dan pencucian pada suhu tinggi. Kedua, membran nitroselulose mudah patah jika kering. Untuk mengatasi masalah ini dikembangkan beberapa jenis membran nilon yang dapat berikatan dengan asam nukleat secara ireversibel dan lebih tahan daripada membran nitroselulose.

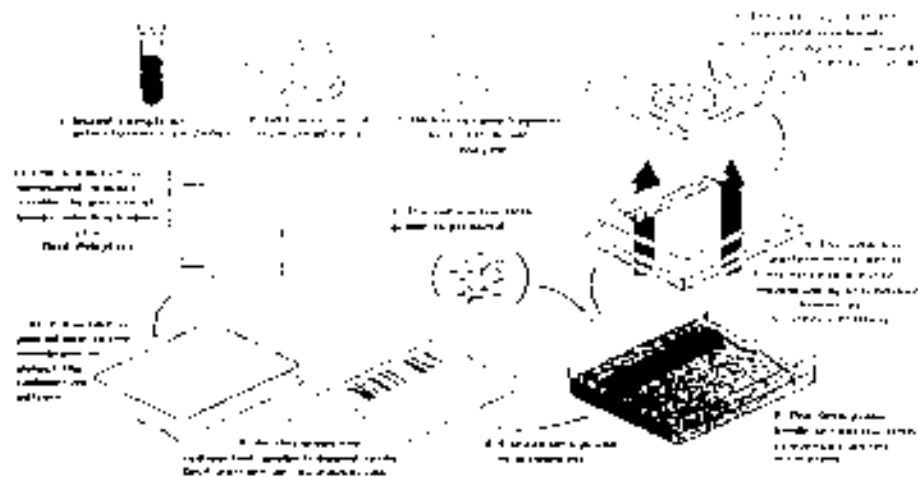
Ada dua jenis membran nilon yang dapat dibeli: nilon tidak dimodifikasi dan nilon dengan modifikasi muatan. Walaupun pada kedua jenis membran nilon itu DNA dapat berikatan, tetapi membran nilon dengan modifikasi muatan lebih disenangi untuk transfer dan hibridisasi, karena permukaannya yang bermuatan positif

mempunyai kapasitas lebih besar untuk mengikat asam nukleat yang bermuatan negatif. Membran nilon harus diperlakukan untuk imobilisasi DNA setelah DNA ditransfer. DNA akan berikatan kuat dengan membran nilon setelah kering atau jika disinari dengan sinar ultraviolet (254 nm) beberapa detik.

Ada beberapa metoda untuk hibridisasi pelacak radioaktif pada asam nukleat yang terikat pada membran. Berbagai metoda ini berbeda dalam beberapa hal:

- Pelarut dan suhu yang digunakan (misalnya, suhu 68°C dalam pelarut air atau 42°C dalam formamid 50%).
- Volume pelarut dan lama hibridisasi (volume yang besar dengan waktu hibridisasi 3 hari atau volume kecil dengan waktu 4 jam).
- Derajat dan metoda penggoyangan.
- Penggunaan pereaksi Denhardt untuk menghalangi penempelan tidak spesifik dari pelacak pada permukaan membran.
- Konsentrasi pelacak dan aktivitas spesifiknya.

Penggunaan senyawa seperti dekstran sulfat atau polietilen glikol, untuk menaikkan kecepatan reasosiasi asam nukleat.



Gambar 2.7 Skema teknik hibridisasi Southern (Sudjadi, 2002)

2.9.5 Hibridisasi non-radioaktif

Seperti diketahui bahwa ^{32}P mempunyai waktu paro pendek, berbahaya karena radiasi dan memerlukan peralatan khusus untuk menggunakan dan membuangnya. Oleh karena itu sistem nonradioaktif dikembangkan untuk menggantikan sistem radioaktif. Sistem deteksi nonradioaktif menghasilkan *signal* dengan mengubah senyawa tak berwarna menjadi berwarna atau berfluorosensi. *Signal* ini dideteksi dengan cara menggabungkan nukleotida berlabel biotin dalam sintesis pelacak. Prosedur pokok hibridisasi nonradioaktif dapat dijelaskan sebagai berikut:

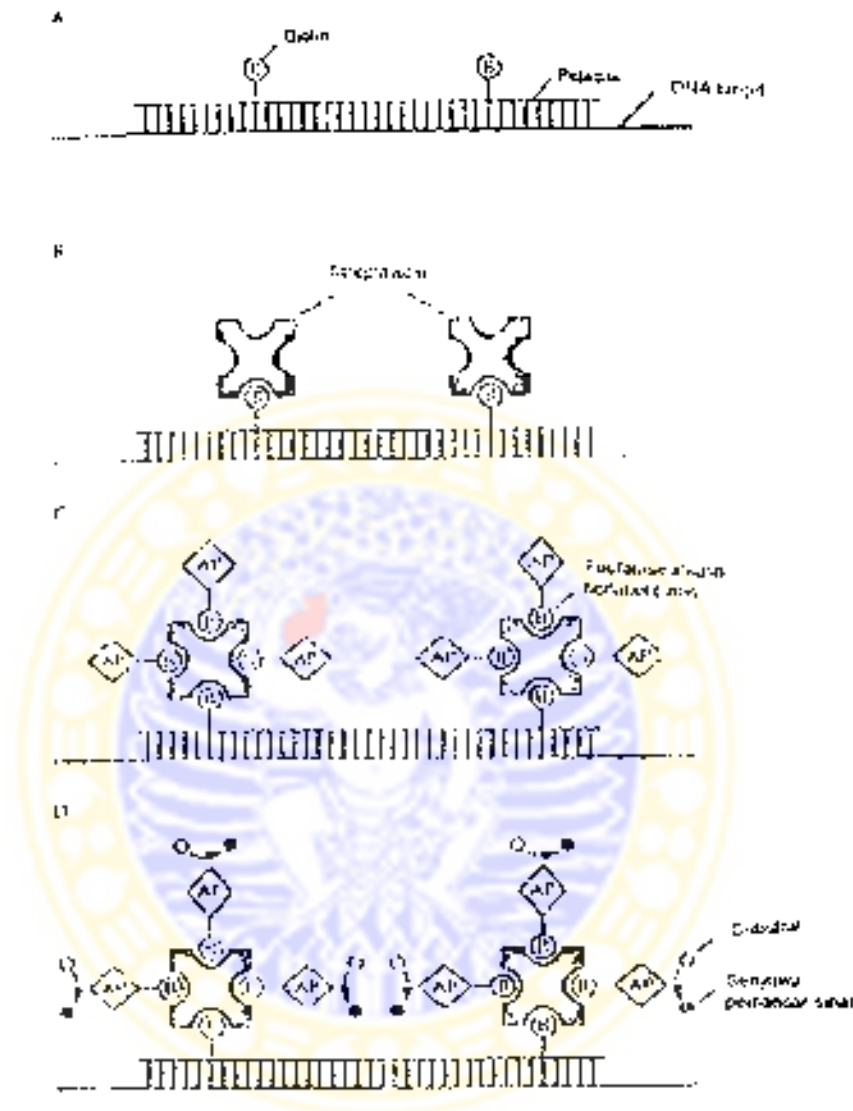
1. Hibridisasi pelacak berlabel biotin pada DNA target (Gambar 2.8a)
2. Tambahkan avidin atau streptavidin (Gambar 2.8b)

3. Tambahkan enzim berlabel biotin, misalnya fosfatase alkali (Gambar 2.8c)
4. Tergantung pada enzim yang digunakan, tambahkan substrat kromogenik atau kemiluminesen maka akan terjadi perubahan warna atau pancaran sinar sebagai akibat dari perubahan substrat menjadi produk yang dapat diukur (Gambar 2.8d)

Cara lain, setelah hibridisasi dengan pelacak berlabel biotin, tambahkan langsung kompleks streptavidin-enzim berlabel biotin. Selain streptavidin dapat juga digunakan avidin yang berikatan kuat dengan biotin. Protein ini mempunyai empat lokus pengenalan sehingga satu molekul avidin atau streptavidin dapat mengikat enzim berlabel biotin dan pelacak berlabel biotin. Pada sistem deteksi kromogenik, enzim mengubah substrat dan menghasilkan senyawa berwarna yang tidak larut dan tetap pada tempat hibrid DNA. Pada sistem kemiluminesen, enzim mengubah substrat menjadi senyawa yang memancarkan sinar.

Sistem non radioaktif menunjukkan beberapa kelebihan daripada sistem radioaktif. DNA berlabel biotin dapat stabil selama satu tahun pada suhu kamar; alat yang dipergunakan untuk mendeteksi kemiluminesen sangat peka. Deteksi sinar yang dipancarkan dengan film sinar X atau luminometer, atau menghitung perubahan warna yang dapat diselesaikan dalam beberapa jam.

Penggunaan kemiluminesen, yang lebih peka daripada kromogenik, diduga akan menjadi sistem pilihan untuk deteksi *signal*.



Gambar 2.8 Deteksi kemiluminesen dari DNA target. B, biotin; AP, fosfatase alkali. (Sudjadi, 2002)

- A. Pelacak berlabel biotin berikatan dengan DNA target.
- B. Streptavidin berikatan dengan molekul biotin.
- C. Fosfatase berlabel biotin berikatan dengan streptavidin.
- D. Fosfatase alkali mengubah substrat menjadi senyawa yang memancarkan sinar

2.9.6 Imunohistokimia

Coons pada tahun 1941 mulai memanfaatkan metoda pemeriksaan imunofloresens memakai antibodi berlabel untuk mendeteksi berbagai antigen yang ada di dalam jaringan. Taylor dan Burns di tahun 1974 mendemonstrasikan kemungkinan aplikasi pemeriksaan imunohistokimia secara rutin dengan pengecatan imunoglobulin pada sel plasma. Dilanjutkan Kohler dan Milstein pada tahun 1975 mulai memperkenalkan tehnik hibridoma untuk menghasilkan antibodi monoklonal, hal ini dianggap suatu langkah besar di bidang imunohistokimia (Mudigdo, 2002).

Imunohistokimia adalah suatu pemeriksaan imunologi dengan menggunakan antibodi sebagai *probe* yang sifatnya spesifik bertujuan untuk mendeteksi suatu antigen dan letaknya di dalam jaringan biopsi (Desai, 2000). Prinsip dasar pemeriksaan imunohistokimia sama dengan imunofloresensi berdasarkan terjadinya antigen antibodi kompleks yang dapat dideteksi apabila antibodi yang mengikatnya telah diberi label. Pada imunohistokimia labelisasi menggunakan aktivitas enzim, yang akan menghasilkan warna setelah diberi tambahan kromogen. Warna akan tampak pada daerah kompleks-enzim-antibodi di dalam jaringan yang terlihat dengan pemeriksaan mikroskop cahaya. Sebagai sarana diagnosis, ada beberapa keuntungan yang didapat dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia, misalnya dengan teknik antibodi

monoklonal dan teknik hibridoma dapat ditingkatkan sensitifitas dan spesifisitasnya (Wasito, 1991). Pemeriksaan imunohistokimia dapat dilakukan dengan berbagai teknik pewarnaan, antara lain: metode peroksidase anti peroksidase, alkali fosfatase anti alkali fosfatase, avidin-biotin kompleks, dan streptavidin-biotin (Wasito, 1991)

2.9.7 Metode peroksidase anti peroksidase (PAP)

Metode ini merupakan varian dari metode uji imunoperoksidase dimana prinsip kerjanya sama dengan pada pemeriksaan imunofloresens. Hanya pada uji imunohistokimia pemberian antibodi berlabel-enzim tidak secara langsung, dimana antibodi yang terikat terdeteksi melalui *labeled antiglobulin*. Teknik imunoperoksidase lebih menguntungkan dibanding imunofloresens, oleh karena pembacaannya menggunakan mikroskop medan gelap, dan sediaan tercat sedemikian rupa, sehingga hubungan struktur jaringan atau struktur sel lebih mudah diamati. Keuntungan lain adalah sediaan yang sudah jadi dapat disimpan secara permanen dan sediaan dapat diadaptasikan untuk pemeriksaan mikroskop elektron. Sedangkan kerugiannya, resolusi mikroskop medan gelap terbatas sekali, sehingga bila terdapat hanya sebagian kecil yang tercat positif, maka hasil pengecatan akan sulit diamati. Kerugian lain peroksidase endogen tidak tereliminasi secara sempurna, dan berbagai produk dari reaksi enzim dapat berdifusi keluar dari jaringan, yang

merupakan tempat antigen terlokalisasi. Pada teknik PAP diperlukan 3 tahap prosedur: jaringan diinkubasi dengan *rabbit antibody* yang akan bereaksi dengan antigen jaringan. Selanjutnya diberi *antirabbit globulin* dan dilanjutkan dengan pemberian imun kompleks yang terdiri dari *rabbit antiperoxidase* yang terikat pada *peroxidase*. Imun kompleks tersebut terikat pada bagian ikatan bebas antiglobulin yang kemudian dapat terdeteksi dengan menggunakan substrat yang telah tersedia.

2.9.8 *Avidin biotin complex*

Avidin adalah suatu glikoprotein dasar dengan berat molekul 68.000, berasal dari putih telur yang mempunyai afinitas tinggi terhadap biotin. Sedangkan biotin merupakan vitamin yang larut dalam air dan dengan berat molekul rendah yaitu 244, namun dapat bergabung dengan berbagai macam protein termasuk reseptor imunoglobulin. Avidin mempunyai 4 bagian ikatan dengan molekul biotin, sedang biotin sendiri dengan mudah dapat bergabung dengan protein termasuk antibodi dan kemudian bereaksi dengan *fluorochrome-coupled avidin*. Sesudah reaksi antigen dengan *unlabeled antibody* maka ditambah *biotin-labeled second antibody*. Karena banyak molekul biotin dapat bergabung dengan avidin, penambahan *fluochrome labeled avidin* akan menghasilkan suatu ikatan kuat dengan membentuk warna yang jelas (Hsu et al, 1980;

Wasito, 1991). Dibandingkan dengan PAP maka uji ABC mempunyai reaktan dengan afinitas yang lebih tinggi serta tidak ada keterbatasan molekul antibodi dengan hanya 2 bagian dalam membentuk kompleks.

2.9.9 Alkalifosfatase anti alkalifosfatase

Prinsip dasar adalah ditemukannya *aryl amines primer*, jika direaksikan dengan alkyl nitrites dalam media asam akan membentuk senyawa-senyawa azo. Senyawa tersebut dapat bereaksi dengan *substituted naphthol* menghasilkan pengecatan yang tidak larut dan bersifat *chromogenic*. Pada prosedur imunohistokimia alkalifosfatase anti alkalifosfatase tersebut, *phosphate ester 6-bromo-2-3-naphthoic acid* digunakan sebagai substrat. Hidrolisis enzimatis dengan *diazotized 4-mino-2-diethoxybenzanilide*.

2.9.10 Metode streptavidin biotin

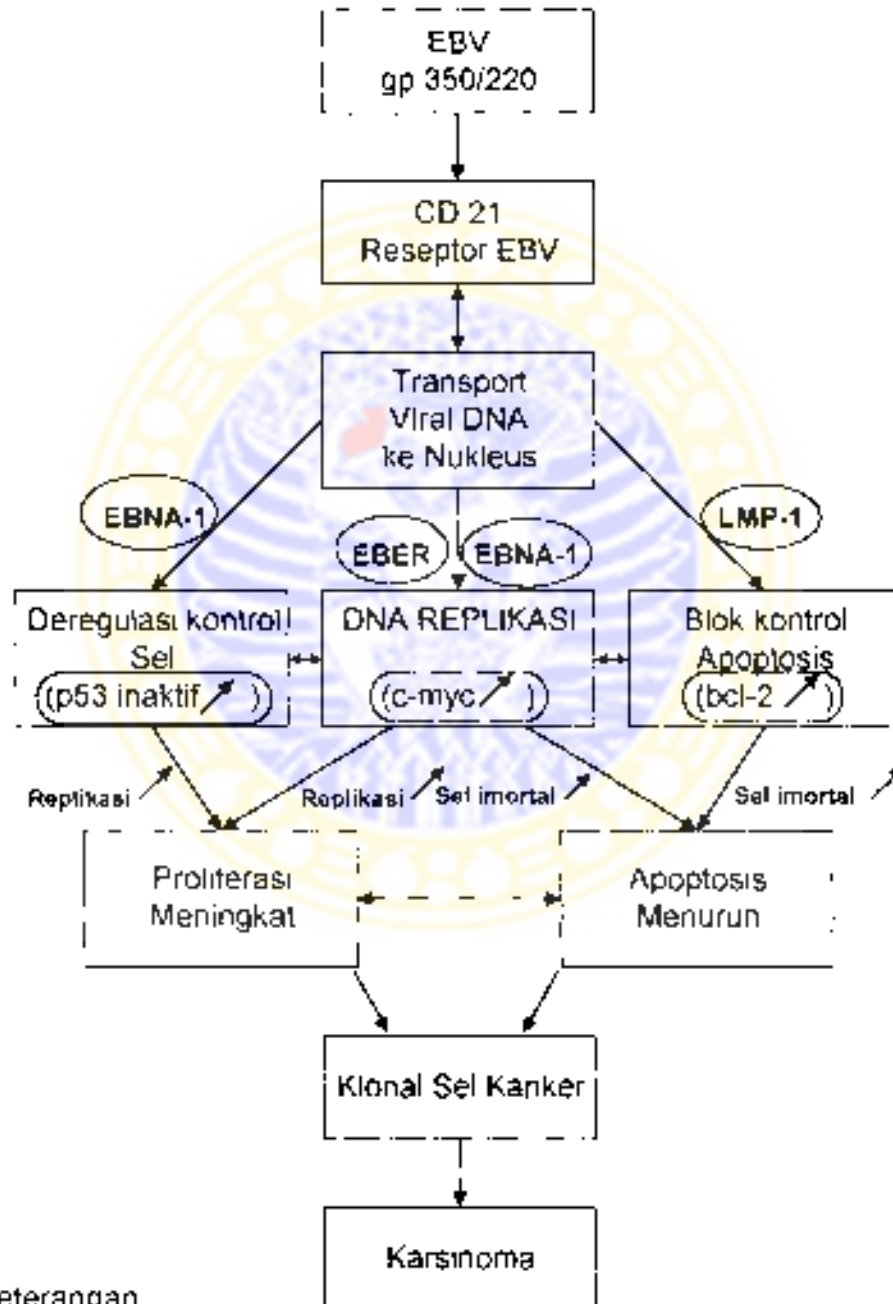
Metode ini banyak digunakan dalam bidang imunologi, karena berbagai kelebihan antara lain biotin yang mudah berikatan dengan berbagai protein, dan ikatan yang amat kuat antara streptavidin dengan biotin. Keuntungan lain adalah dapat mengeliminasi ikatan lain yang non spesifik karena mempunyai kandungan karbohidrat rendah dan titik isoelektrik yang mendekati netral, sehingga tidak

terjadi berbagai reaksi non spesifik yang sering terjadi pada ikatan dengan avidin. Oleh karena itu streptavidin-biotin dianggap lebih bagus bila dibandingkan dengan avidin-biotin kompleks, karena streptavidin mempunyai kemampuan mengikat biotin lebih banyak dan sangat kuat, sehingga hasil pewarnaan menjadi lebih jelas. *Streptavidin-biotin* juga lebih menguntungkan dibanding PAP, karena pada teknik ini menggunakan reagensia pelabel tunggal umum yaitu berupa *conjugated streptavidin enzyme* sebagai ganti PAP kompleks yang berbeda untuk setiap sistem organ (Wasito, 1991).




BAB 3
KERANGKA KONSEP

3.1 Bagan Kerangka Konseptual



Keterangan.

 Molekul yang diperiksa

3.2 Keterangan Bagan Kerangka Konsep

Pada membran Epstein Bar Virus diliputi oleh glycoprotein (gp) 350 atau 220 kda yang dapat berikatan dengan sel epitel melalui reseptor CD 21 yang homolog dengan gp 350/220. Ikatan antara EBV dan sel epitel akan memudahkan EBV untuk mentransport virus DNA ke dalam inti sel. Keadaan ini menyebabkan EBV dapat menetap secara tersembunyi di dalam inti sel inang. EBV yang berada dalam sel epitel tersebut berbentuk episom EBV. Genom episom ini terdiri atas RNA-EBV (EBER), *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) dan *EBV Nuclear Antigen-1* (EBNA-1). Produk genetik EBV dapat melakukan transaktivasi dengan berbagai gen, seperti protoonkogen menjadi onkogen dan supresor gen. EBNA-1 dapat mengganggu regulasi supresor gen p53, sehingga menjadi p53 mutan dan akibatnya fungsi gen ini menjadi inaktif. Hal ini tampak bersamaan didapatkannya ekspresi p53 inaktif yang tinggi, sehingga proliferasi sel tidak bisa dihentikan. *Latent membrane Protein-1* (LMP-1) dapat menekan fungsi kontrol gen antiapoptotik dengan meningkatkan ekspresi bcl-2. Apoptosis dihambat, sehingga mengakibatkan sel menjadi *immortal*. Di samping itu dengan ditemukan RNA-EBV (EBER) dalam sel inang, keberadaan EBER di dalamnya akan mempengaruhi faktor transkripsi yaitu c-myc. Peningkatan ekspresi c-myc dapat memacu replikasi DNA dan siklus sel yang terus menerus menyebabkan proliferasi sel meningkat.

Pada kondisi yang demikian ini, maka terjadi gangguan fungsi kontrol proliferasi dan apoptosis sel inang. Hal ini akan memicu pembentukan klonal sel tumor yang tidak mati (*immortal*) dan akhirnya berkembang menjadi sel kanker.

3.3 Hipotesis

Terdapat perbedaan antara ekspresi EBER, EBNA-1, LMP-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 pada kelompok KSSRM yang terinfeksi EBV, tidak terinfeksi EBV dan kontrol



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk penelitian *observational analitik* dengan menggunakan penderita karsinoma sel skuamosa rongga mulut sebagai obyek penelitian. Pada penelitian ini diidentifikasi frekuensi infeksi EBV melalui RNA-EBV (EBER) dan diperiksa ekspresi *Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1)*. Juga diperiksa p53 inaktif, bcl-2, c-myc, sebagai regulator proliferasi dan apoptosis sel kanker. Perbedaan ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 dibandingkan antara kelompok karsinoma sel skuamosa yang terinfeksi dengan yang tidak terinfeksi EBV dan kontrol.

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dipakai *cross sectional study*. Kelompok yang akan diteliti adalah karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Untuk mendapatkan sampel, maka pengambilan sampel kasus karsinoma sel skuamosa rongga mulut dilakukan secara *purposive sampling*. Mengingat kesadaran masyarakat terhadap KSSRM masih rendah maka jumlah kasus kanker ini masih sedikit, selain itu untuk mendapatkan sampel didasarkan pada kriteria klinis

dan hasil pemeriksaan histopatologis dengan diagnosis karsinoma sel skuamosa.

Penentuan infeksi EBV pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut dengan pemeriksaan *insitu hybridization* RNA-EBV pada inti sel inang, sedangkan ekspresi LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 dengan pemeriksaan imunohistokimia menggunakan *monoclonal antibody* LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2. Pemeriksaan *insitu hybridization* dan imunohistokimia dilakukan secara *blinding*, pemeriksa tidak mengetahui identitas subyek.

4.3 Penentuan Besar Sampel

Penentuan besar sampel didasarkan pada penelitian pendahuluan dengan membandingkan ekspresi p53 inaktif pada karsinoma sel skuamosa yang terinfeksi EBV dalam hal ini positif EBER pada inti sel kanker dibandingkan yang tidak terinfeksi atau EBER negatif.

Rumus untuk mencari besar sampel (n) menurut Higgins (1985) adalah:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S_c^2}{(X_c - \bar{X}_t)^2}$$

Keterangan:

f = proporsi yang gagal 5%

\bar{X}_c = Nilai rerata p53 inaktif kelompok kontrol

\bar{X}_t = Nilai rerata p53 inaktif kelompok perlakuan

SD = Standar deviasi p53 inaktif kelompok kontrol

Perhitungan besar sampel:

$$Z = 1,98 \quad \bar{X}_c = 116,42$$

$$Z = 1,29 \quad \bar{X}_t = 106,62$$

$$F = 0,5 \quad SD = 8,31126$$

Rumus:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 SD^2}{(\bar{X}_c - \bar{X}_t)^2}$$

$$n = \frac{1}{(1-0,5)} \times \frac{2(1,98 + 1,29)^2 (8,31126)^2}{(116,42 - 106,62)^2}$$

$$n = \frac{1}{(1-0,5)} \times \frac{2(3,27)^2 (69,022)}{(9,80)^2}$$

$$n = \frac{1}{0,5} \times \frac{2(10,6276) \cdot (69,022)}{96}$$

$$n = \frac{1468,245}{192} = 7,74085 = 8$$

Besar sampel (n) pengulangan yang harus dilakukan pada penelitian ini adalah 8 kali. Mengingat penelitian ini mempunyai 3 kelompok maka sampel yang dibutuhkan pada penelitian ini sebanyak 24.

4.4 Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan *cross sectional*, maka tidak mencantumkan variabel bebas dan variabel tergantung.

Variabel penelitian terdiri atas:

1. Kelompok karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi EBV dengan pemeriksaan *insitu hybridization* RNA-EBV dan ekspresi LMP-1 dan EBNA-1 positif.
2. Kelompok karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang tidak terinfeksi EBV dengan pemeriksaan *insitu hybridization* RNA-EBV dan ekspresi LMP-1 dan EBNA-1 negatif.
3. Ekspresi p53 inaktif, bcl-2 dan c-myc baik pada kelompok karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang positif infeksi EBV dan yang negatif infeksi EBV dengan pemeriksaan imunohistokimia

4.5 Batasan Operasional

1. Infeksi EBV ditentukan dengan keberadaan RNA-EBV pada sel KSSRM, ditentukan pula oleh ekspresi *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal LMP-1 produksi Novo, ditentukan pula ekspresi *EBV Nuclear Antigen-1* (EBNA-1) dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal EBNA-1 produksi Novo.

2. Ekspresi p53 inaktif, bcl2 dan c-myc adalah penilaian protein yang menyandi gen p53, bcl-2 dan c-myc dengan Immunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal terkait.
3. Karsinoma sel skuamosa rongga mulut adalah keganasan di mukosa rongga mulut jenis skuamosa yang ditentukan dengan pemeriksaan histopatologis, menggunakan pengecatan reguler HE
4. Kelompok baru adalah kelompok yang dibuat berdasar ekspresi EBER, EBNA-1, LMP-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2.
5. Pola diskriminan "molekuler grading" adalah gambaran kontribusi setiap diskriminator terhadap kejadian KSSRM yang terinfeksi dan tidak terinfeksi EBV.
6. Paradigma patobiologi molekuler adalah model berpikir yang didasari pada ketidakseimbangan molekuler biologis, yaitu perubahan regulasi p53, c-myc dan bcl-2 pada karsinogenesis KSSRM akibat terinfeksi EBV.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi

1. Bagian *Oral medicine*, Bedah Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Unair dan klinik bedah Onkologi Kepala Leher RSUD Dr. Soetomo: untuk mendapatkan sampel KSSRM yang memenuhi kriteria klinik.

2. Laboratorium Histopatologi di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unair pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan Hematoksin Eosin untuk menentukan diagnosis karsinoma sel skuamosa rongga mulut.
3. Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD Dr. Soetomo untuk melakukan biopsi operasi.
4. Laboratorium Patobiologi di Gramik Fakultas Kedokteran Unair untuk penyimpanan jaringan segar dengan nitrogen cair
5. Instalasi Patologi Anatomi RS Dr. Sardjito Yogyakarta untuk melakukan *insitu hybridization* dan imunohistokimia.
6. Laboratorium Patologi Anatomi dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UGM untuk pemeriksaan kuantifikasi hasil pengecatan.

4.6.2 Waktu

Pengumpulan sampel jaringan segar karsinoma sel skuamosa rongga mulut dimulai sejak Proposal Penelitian diterima November 2002 sampai dengan Agustus 2003.

Pemeriksaan *insitu hybridization* dan imunohistokimia dimulai sejak September 2003 sampai dengan Desember 2003.

4.7 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah penderita kanker Rongga Mulut yang datang berobat ke Fakultas Kedokteran Gigi Unair dan di

Instalasi Bedah Kepala dan Leher RSUD Dr Soetomo Surabaya. Penderita kemudian dilakukan biopsi operasi oleh ahli bedah kanker. Semua penderita yang dilakukan biopsi operasi telah menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Semua penderita yang memenuhi kriteria sebagai karsinoma sel skuamosa rongga mulut dikutsertakan dalam penelitian.

4.8 Kriteria Sampel dan Kriteria Inklusi

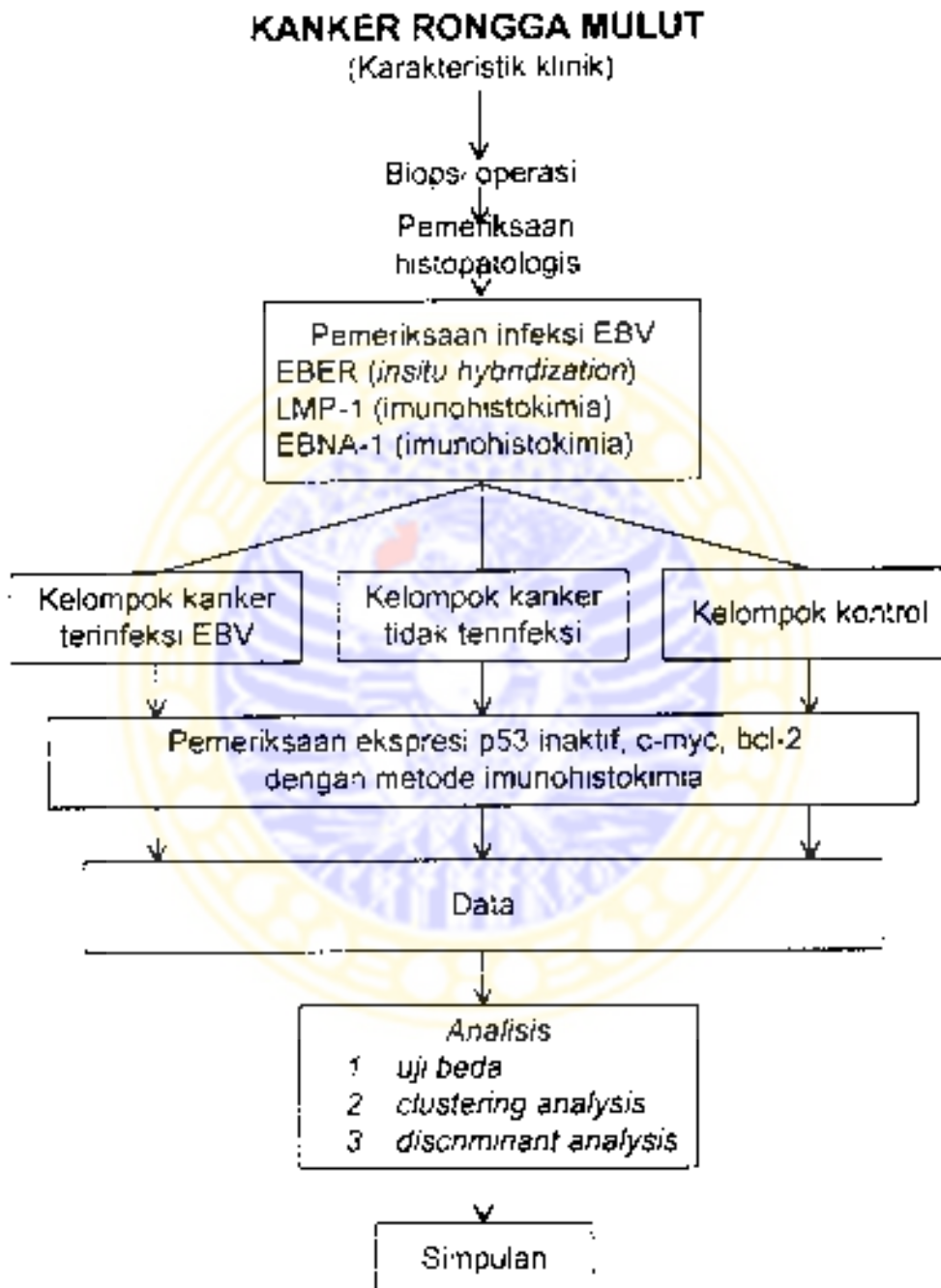
4.8.1 Kriteria sampel

1. Umur antara 30 – 70 tahun
2. Bangsa Indonesia suku Jawa
3. Tidak menderita tumor dan keganasan lain
4. Secara klinis tidak menderita infeksi dan kondisi umum baik.
5. Penderita dari poliklinik *Oral Medicine* FKG Unair dan Bedah Onkologi Kepala Leher RSUD Dr. Soetomo yang datang untuk pertama kali pada saat diagnosa karsinoma sel skuamosa rongga mulut ditentukan.

4.8.2 Kriteria inklusi kelompok kasus

Penderita dengan pemeriksaan histopatologi karsinoma sel skuamosa rongga mulut baru yang terinfeksi EBV, dilakukan biopsi pertama kali. Jenis kanker secara histopatologis karsinoma skuamosa

KERANGKA OPERASIONAL PENELITIAN



Rn

4.9 Cara Kerja

1. Pengambilan spesimen biopsi kanker rongga mulut dilakukan di Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD Dr. Soetomo Surabaya, oleh tim dokter bedah kepala dan leher yang diberi wewenang membantu penelitian. Hasil biopsi segera dimasukkan ke dalam *deep freezer* dengan suhu -70°C dan menunggu proses pemeriksaan *insitu hybridization* dan imunohistokimia, penderita telah menandatangani *informed consent*.
2. Teknik *insitu hybridization* sesuai dengan metode yang dipublikasikan oleh DAKO, *insitu hybridization* metode untuk menganalisis RNA. Menggunakan produk DAKO yaitu *probe peptida nucleic acid (PNA) RNA-EBV (EBER)* yang telah dicoba dengan jaringan atau sel yang berisi EBV, CMV, HHV, HSV, VZV, HBV namun hanya positif pada jaringan yang terinfeksi EBV. Pembuatan slide preparat berasal dari jaringan segar, dicelupkan dalam *cryomatrix*, kemudian dilakukan potong beku setebal $5\ \mu\text{m}$, teknik ini didasarkan pada pembentukan dupleks antara dua untai asam nukleat yang komplementer, kemudian terjadi pasangan secara tepat antara dua untai DNA RNA yang komplementer. Ada 3 unsur yang penting yaitu: DNA pelacak, DNA target dan Deteksi signal. Langkah Kerja: (1). Denaturasi fragmen DNA sehingga menjadi rantai tunggal dengan memberi

150 μ l proteinase K terlarut TBS. (2). Kemudian dilakukan *hybridization* dengan memberi *fluorescent conjugated PNA probe* maka DNA pelacak mencari pasangannya yang komplementer. dengan memasukkan slide dalam inkubator temperatur 55°C selama 1,5 jam. (3) Tahap berikutnya adalah deteksi sinyal namun sebelumnya harus dicuci dengan *stringent wash solution* selama 25 menit pada suhu 55°C. deteksi sinyal ini dengan memberi enzim biotin-fosfatase (Anti FITC/AP). AP ini yang akan mengubah substrat menjadi senyawa yang memancarkan sinar yang tidak larut dan tetap ada pada tempat DNA hibrid. Hasil *hybridization* dapat stabil selama 1 tahun pada suhu kamar, selain itu dapat dihitung perubahan warna/sinar yang terpancar dalam beberapa jam dan sangat peka hanya bereaksi pada DNA target.

3. Pewarnaan immunohistokimia (1). Spesimen biopsi mukosa rongga mulut setelah difiksasi dengan buffer formalin selanjutnya dilakukan dehidrasi dan pembuatan blok parafin menggunakan metoda baku. Selanjutnya disiapkan kaca obyek yang telah dilapisi poli L lisin, pemotongan blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 μ m, potongan jaringan ditebarkan/diapungkan pada permukaan bak pemanas berisi air hangat. selanjutnya jaringan yang telah menempel pada *slide* dilakukan deparafinisasi dan sediaan siap untuk dilakukan

**

pewarnaan. (2). Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal p53 inaktif, bcl-2, c-myc, LMP-1 dan EBNA-1 dengan teknik Avidin Biotin Complex (Novo Castra Biotin System), bertujuan supaya hasil pewarnaan menjadi lebih kuat dan jelas oleh karena telah teramplifikasi.

4. Pemeriksaan EBER yang positif dengan menggunakan mikroskop cahaya akan nampak sel kanker yang terinfeksi EBV inti berwarna coklat kehitaman ukuran kecil di antara sel kanker negatif EBER yang berwarna kebiruan. Pemeriksaan LMP-1 yang positif dengan menggunakan mikroskop cahaya tampak sel kanker yang mengekspresikan LMP-1 pada membran inti akan tampak berwarna coklat kehitaman berbentuk *patches* di antara sel kanker yang negatif LMP-1 berwarna kebiruan. Pemeriksaan EBNA-1 yang positif dengan menggunakan mikroskop cahaya tampak sel kanker yang mengekspresikan EBNA-1 pada inti berwarna coklat kehitaman di antara sel kanker yang negatif EBNA-1 berwarna kebiruan. Pemeriksaan ekspresi p53 menggunakan antibodi monoklonal p53 mutan (DAKO), sel kanker yang positif p53 mutan memberikan warna coklat kehitaman pada inti di antara sel kanker yang negatif p53 mutan berwarna kebiruan. Pemeriksaan ekspresi c-myc menggunakan antibodi monoklonal (Lab Vision), sel kanker yang positif c-myc memberi warna coklat kehitaman pada inti di antara sel kanker

yang negatif c-myc berwarna kebiruan. Pemeriksaan ekspresi bcl-2 menggunakan antibodi monoklonal produksi Santa Cruz, sel kanker yang positif bcl-2 memberi warna coklat kehitaman pada sitoplasma di antara sel kanker yang negatif bcl-2 berwarna kebiruan.

5. Penilaian hasil pewarnaan secara mikroskopis dilakukan secara kualitatif dengan melihat intensitas penyerapan warna, serta secara kuantitatif dengan menghitung jumlah sel yang positif menyerap warna. Setelah pemeriksaan mikroskopis, selanjutnya dilakukan pengambilan dokumentasi mikrofoto dengan camera digital Pentax Optio 230 2.0 mega pixel, film Kodak Asa 200 dicetak pada kertas dengan pantulan cahaya minimal.

4.10 Unit Analisis

Unit analisis penelitian berupa jaringan hasil biopsi operasi penderita yang memenuhi kriteria. Sebelum penelitian dimulai, dilakukan presentasi dan penjelasan tentang maksud dan tujuan penelitian di hadapan Tim yang terkait antara lain: Spesialis Bedah Onkologi, Spesialis Bedah Kepala Leher, Spesialis Anastesi dan tenaga paramedis serta Spesialis Patologi Anatomi di Gedung Bedah Pusat Terpadu RSUD Dr. Soetomo. Untuk mendapatkan sampel yang representatif ditentukan volume sampel minimal 1x1x1 mm

4.11 Analisis Data

Terhadap data yang diperoleh, dilakukan analisis statistik sebagai berikut.

1. Uji homogenitas untuk mengetahui homogenitas sampel.
2. Uji *identically, independency* dan *normality* (IIDN) untuk membuktikan normalitas data
3. Uji Manova untuk membuktikan perbedaan ekspresi EBER, LMP-1, EBNA, ekspresi p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2 antara kelompok terinfeksi dan tidak terinfeksi EBV, serta kontrol.
4. *Clustering* berdasarkan semua variabel yang diuji.
5. Analisis diskriminan untuk mendapatkan diskriminator antara kelompok baru dan kontrol.
6. Membuat pola diskriminator kelompok baru yang terinfeksi EBV, tidak terinfeksi EBV dan kontrol

4.12 Etik Penelitian

Etik penelitian dilaksanakan sesuai dengan kaidah yang berlaku. *Ethical clearance* dari komisi etik.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS

5.1 Infeksi EBV pada Sel Kanker

Mengingat pengambilan secara *purposive sampling* maka semua kasus yang memenuhi kriteria diikutkan penelitian, didapatkan sebanyak 35 sampel, yang terdiri dari 17 kasus karsinoma sel skuamosa yang terinfeksi EBV, 8 kasus karsinoma sel skuamosa yang tidak terinfeksi EBV dan 10 kasus sebagai kelompok kontrol. Mengingat pertimbangan etik dan sesuai tujuan penelitian untuk mendapatkan kelompok baru karsinogenesis pada KSSRM maka kelompok kontrol berasal dari jaringan normal pada penderita yang sama.

Dari hasil penelitian terhadap karsinoma sel skuamosa kasus yang terinfeksi EBV ditunjukkan dengan keberadaan RNA-EBV (EBER), *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) dan EBV *Nuclear Antigen-1* (EBNA-1), ditemukan sebanyak 17 kasus, sedangkan yang tidak terinfeksi sebesar 8 kasus dan 10 kasus sebagai kelompok kontrol.

Tabel 5.1 Jumlah anggota sampel pada KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol

Kelompok KSSRM	Jumlah
Terinfeksi EBV	17
Tidak terinfeksi	8
Normal (kontrol)	10
Total	35

Pada kelompok KSSRM yang terinfeksi EBV (*insitu hybridization* EBER dan ekspresi LMP-1 dan EBNA-1), tidak terinfeksi EBV dan kontrol dilakukan pemeriksaan ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2. Dari variabel infeksi EBV (EBER, LMP-1, EBNA-1) dan ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 dilakukan uji multivariat untuk mendapatkan perbedaan antar kelompok.

Tabel 5.2 Perbedaan ekspresi EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 pada kelompok KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol

Kelompok Kanker Dan kontrol Variabel	Kelompok Kanker				Kontrol	
	Terinfeksi		Tidak terinfeksi			
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
EBER	27,06	25,92	0,00	0,00	0,00	0,00
LMP-1	16,47	20,29	0,00	0,00	0,00	0,00
EBNA-1	14,71	13,75	0,00	0,00	0,00	0,00
p53 (in)	34,71	13,23	21,88	15,10	0,00	0,00
c-myc	32,94	26,67	19,37	19,72	0,00	0,00
bcl-2	6,18	17,99	7,50	4,63	0,00	0,00

Dilakukan uji multivariat dengan metode Wilk's lambda, hasil sebagai berikut: F hitung 6,553 dengan tingkat signifikan 0,00 ($p < 0,05$) berarti ada perbedaan bermakna keberadaan variabel penelitian antar kelompok kanker yang terinfeksi EBV, tidak terinfeksi EBV dan kontrol.

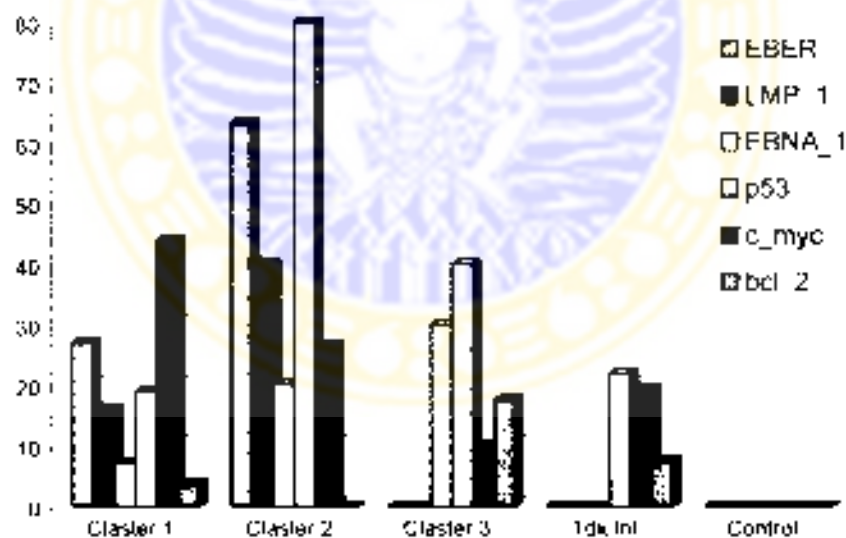
5.2 Kelompok Baru Karsinoma Sel Skuamosa

Dari hasil analisis data penelitian ini terdapat sebaran yang heterogen pada kelompok kanker. Hal ini tercermin pada nilai SD yang tinggi, baik pada kelompok kanker yang terinfeksi EBV maupun pada kelompok yang tidak terinfeksi. Keadaan ini kemungkinan karena kriteria sampel diambil berdasar pemeriksaan seluler, sedangkan variabel penelitian berdasar pemeriksaan molekuler. Berdasarkan hal tersebut maka peneliti membuat kelompok baru dengan analisis *clustering*. Dari hasil pengelompokan didapatkan 3 kelompok yaitu: kelompok baru 1, 2 dan 3. Selain itu dalam penelitian ini masih menggunakan dua kelompok, yaitu: tidak infeksi dan kontrol (Tabel 3).

Tabel 5.3 Kelompok baru KSSRM yang terinfeksi berdasarkan EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2, dan tidak infeksi serta kontrol

Kelompok baru	1		2		3		Tidak infeksi		Kontrol	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
EBER	27,00	18,29	63,33	20,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LMP-1	0,00	0,00	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
EBNA-1	0,00	0,00	20,00	0,00	30,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
p53 inaktif	18,00	24,24	80,00	0,00	50,00	14,14	21,88	15,10	0,00	0,00
c-myc	44,00	21,87	26,67	20,82	10,00	1,55	10,38	19,72	0,00	0,00
bcl-2	3,50	0,14	0,00	0,00	17,50	3,50	1,50	1,50	0,00	0,00

Gambar 5.1 Grafik kelompok baru KSSRM yang terinfeksi berdasarkan EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, dan bcl-2, dan tidak infeksi serta kontrol



Dari kelompok baru dilakukan uji multivariat metode Wilk's lambda dengan hasil sebagai berikut F hitung 0.030, signifikan 0.00 ($p < 0.05$) terbukti ada perbedaan bermakna variabel antar kelompok baru dan kontrol

5.3 Penentuan Diskriminator

Berdasarkan pengelompokan karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang telah ditemukan ternyata ada perbedaan variabel antar kelompok. Mengingat hal itu maka dibuat analisis diskriminan untuk mendapatkan diskriminator. Dari analisis diskriminan diperoleh 5 diskriminator yang paling berperan yaitu EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc.

Tabel 5.4 Koefisien Fisher's dari setiap diskriminator kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol

Kelompok baru Variabel	1	2	3	Tidak Infeksi	Kontrol
EBER	0,373	1,017	0,291	6,111E-03	5,328E-03
LMP-1	0,244	0,541	-4,127E-02	5,097E-02	3,974E-03
EBNA-1	0,116	0,504	1,052	-0,304	-1,277E-02
p53 (in)	0,108	0,485	-3499E-03	0,148	7,187E-03
c-myc	0,116	-3,212E-02	-0,126	6,670E-02	4,862E-03
Nilai konstanta	-12,586	-68,655	-16,682	-3,878	-1,618

5.4 Mekanisme Proliferasi dan Apoptosis

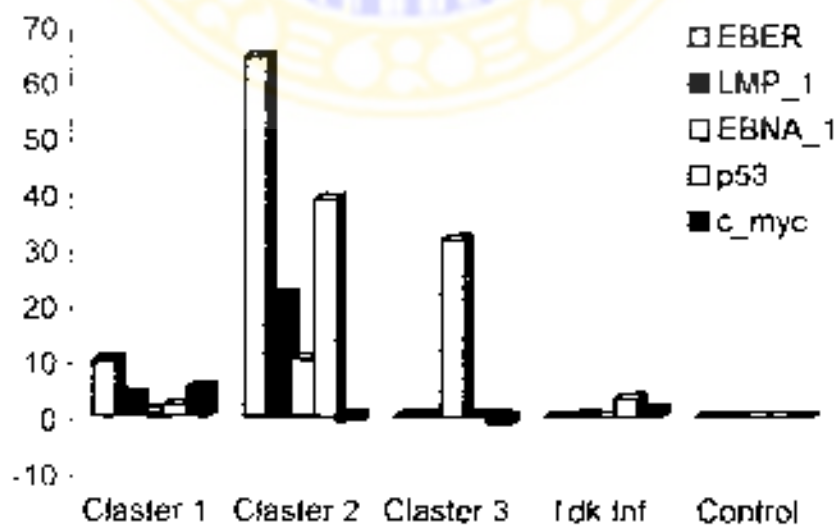
Untuk dapat menjelaskan karsinogenesis dalam penelitian ini didasarkan atas mekanisme proliferasi dan apoptosis KSSRM. Dibuat pola diskriminan yang merupakan pola diskriminator "molekuler grading" dengan memperhitungkan besaran dari kontribusinya. Hal ini dapat menjelaskan kontribusi diskriminator terhadap proliferasi dan apoptosis pada pengelompokan KSSRM

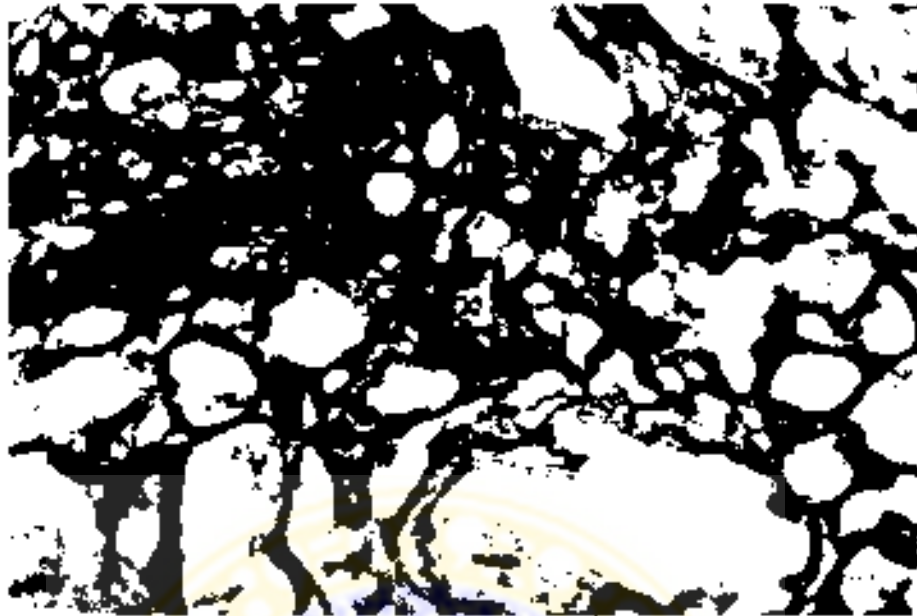
yang terinfeksi EBV tersebut. Untuk mendapatkan kontribusi setiap diskriminator tersebut, maka dilakukan perkalian antara nilai konstanta koefisien Fisher's linear dengan rerata data asli, dan diperoleh data seperti yang tercantum dalam tabel sebagai berikut:

Tabel 5.5 Nilai score diskriminator (EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 aktif dan c-myc) pada kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi EBV dan kontrol

Variabel	Pola			Tidak Infeksi	Kontrol
	1	2	3		
EBER	10,071	64,41	0,00	0,00	0,00
LMP-1	3,904	21,64	0,00	0,00	0,00
EBNA-1	0,812	10,08	31,56	0,00	0,00
p53	2,052	38,80	-0,14	3,2375	0,00
c-myc	5,104	-0,85	-1,26	1,2923	0,00

Gambar 5.2 Pola diskriminan ('molekuler grading') dari diskriminator EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc pada kelompok baru KSSRM yang terinfeksi, tidak terinfeksi dan kontrol

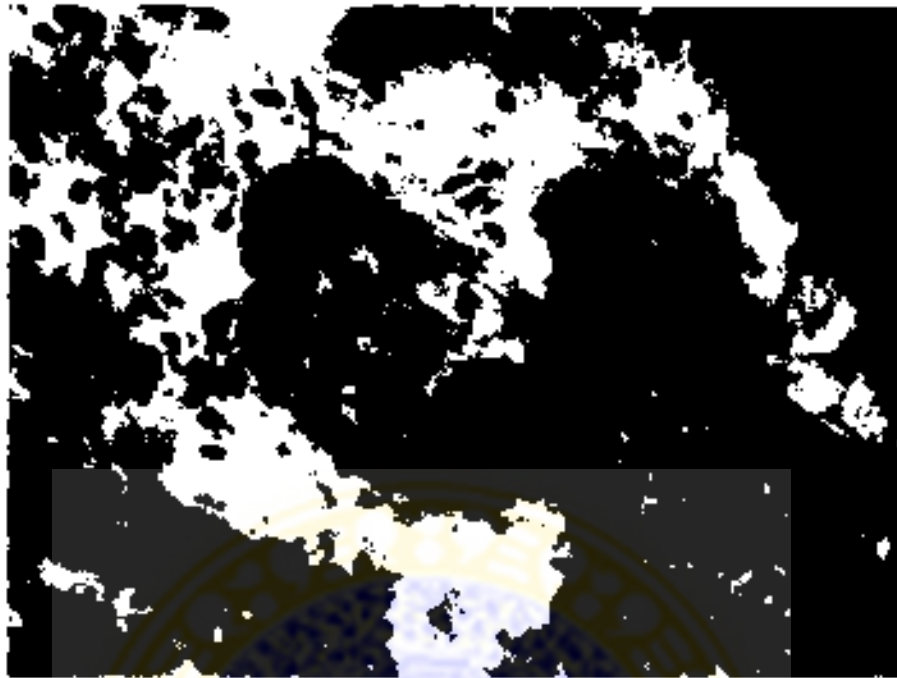




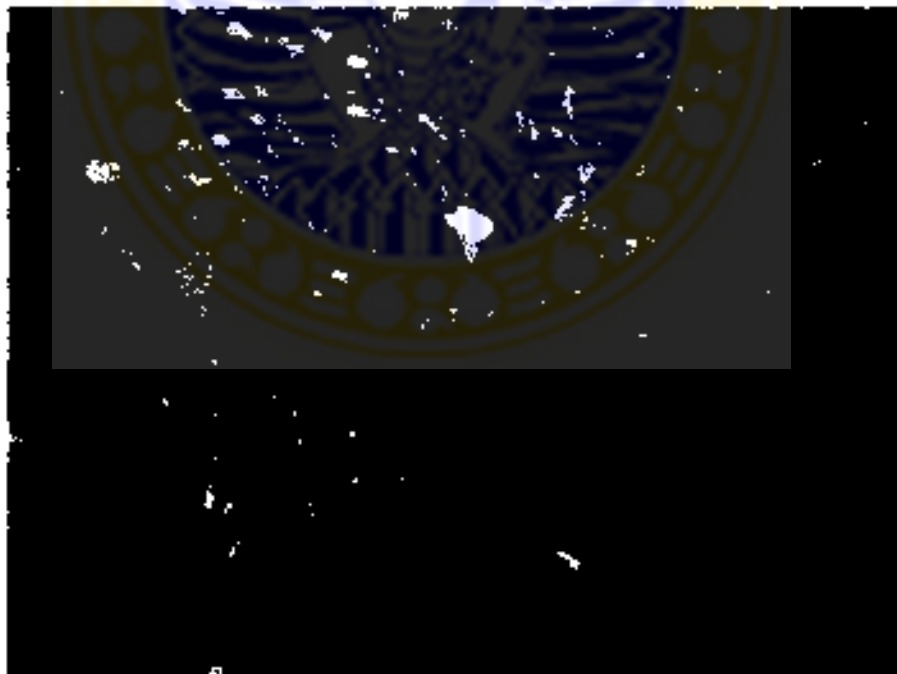
Gambar 5.3 Sel kanker dengan *insitu hybridization* EBER, inti berwarna coklat kehitaman dan kecil (Pembesaran 400 X)



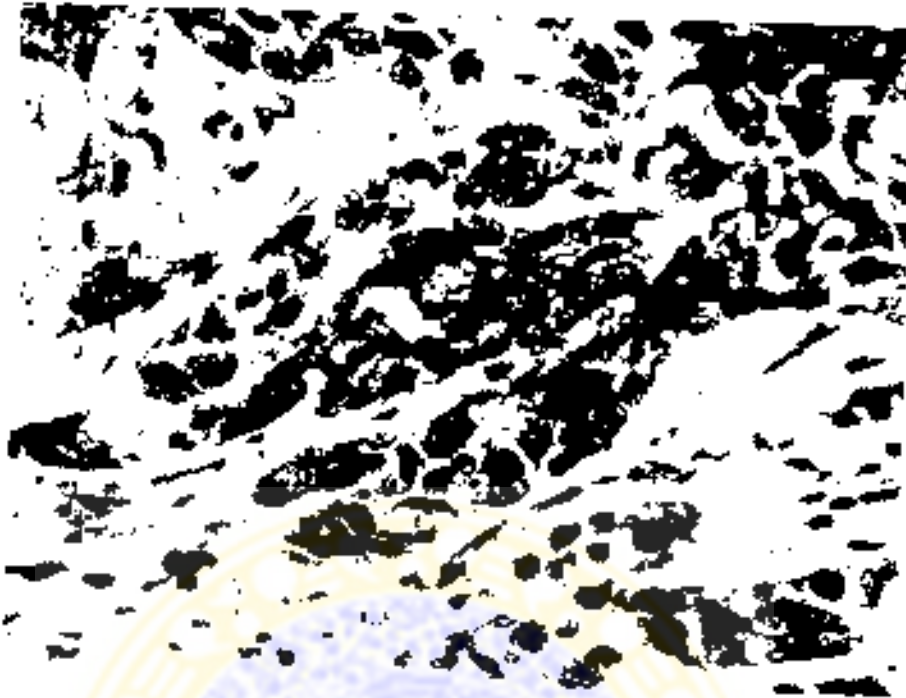
Gambar 5.4 Sel kanker dengan ekspresi LMP-1, menggunakan *monoclonal antibody* LMP-1, pada membran inti berwarna coklat kehitaman (Pembesaran 400 X)



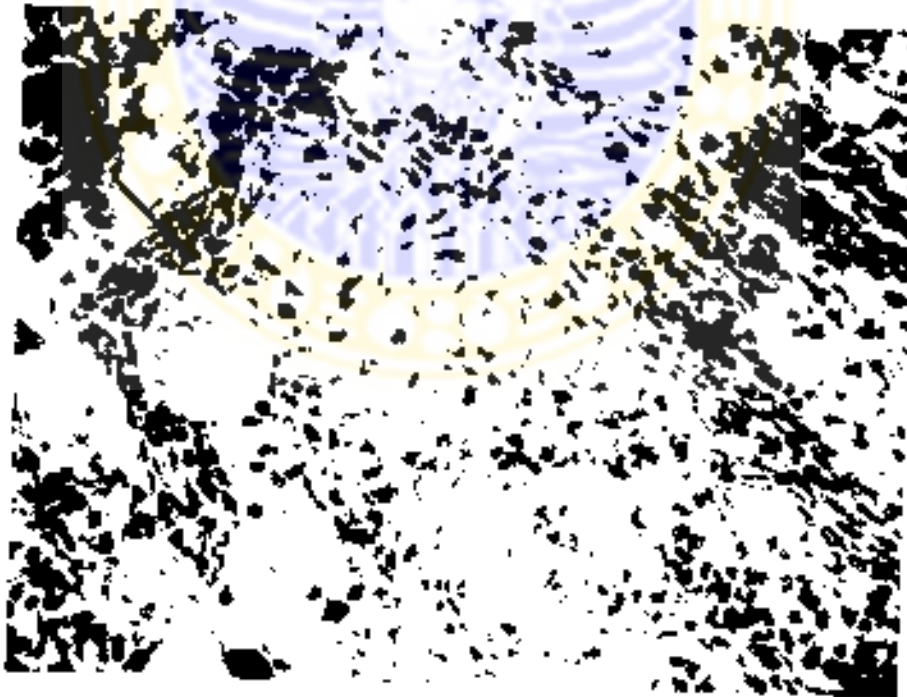
Gambar 5.5 Sel kanker dengan ekspresi EBNA-1, menggunakan *monoclonal antibody* EBNA-1, pada inti berwarna coklat kehitaman (Pembesaran 400 X)



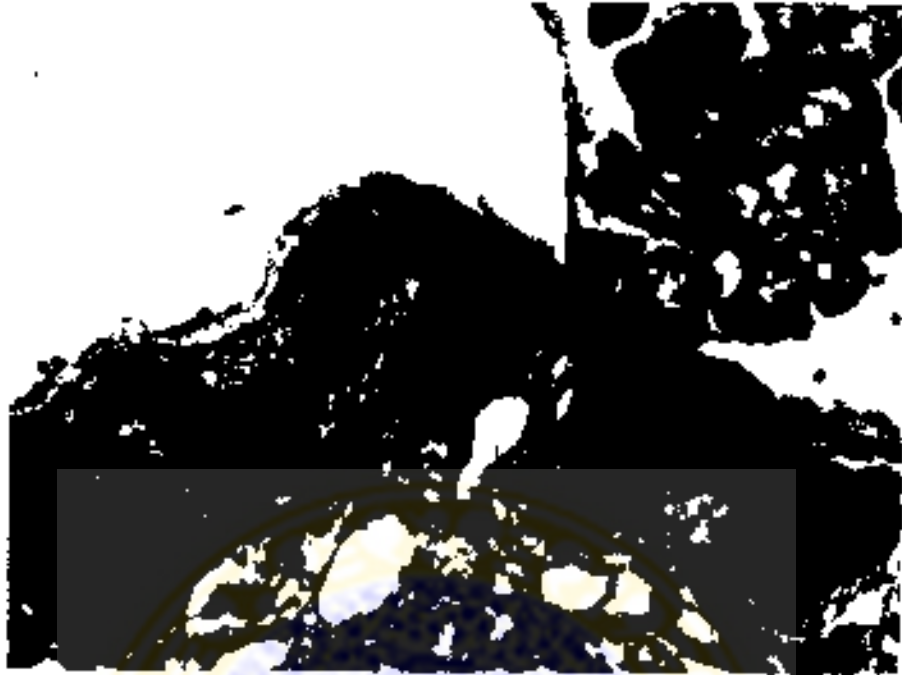
Gambar 5.6 Sel kanker dengan ekspresi c-myc, menggunakan *monoclonal antibody* c-myc, pada inti berwarna coklat kehitaman (Pembesaran 400 X)



Gambar 5.7 Sel kanker dengan ekspresi bcl-2, menggunakan *monoclonal antibody* bcl-2, pada sitoplasma berwarna coklat kehitaman (Pembesaran 400 X)



Gambar 5.8 Sel kanker dengan ekspresi p53 inaktif, menggunakan *monoclonal antibody* p53 inaktif, pada inti berwarna coklat kehitaman (Pembesaran 400 X)



Gambar 5.9 Epitel skuamus normal dengan pengecatan HE, (pembesaran 400 X)

BAB 6

PEMBAHASAN

Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut (KSSRM) saat ini merupakan salah satu keganasan yang banyak dijumpai di Indonesia, khususnya di Jawa Timur. Data registrasi kanker berdasarkan pemeriksaan histopatologis di Jawa Timur menunjukkan terjadi peningkatan setiap tahun (Budhy, 1995) dan menempati urutan ke 6 dari seluruh kanker yang paling sering terjadi di dunia (Hsieh, 2001). Berdasar data penelitian ini, KSSRM yang terinfeksi EBV sebanyak 17 dari 25 kasus KSSRM, yang dikumpulkan selama 10 bulan dan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Dari data klinik menunjukkan bahwa KSSRM sering ditemukan pada keadaan lanjut dan *non operable*. Hal ini kemungkinan karena pada stadium dini asimtomatik sehingga penderita tidak merasakan perubahan secara umum pada tubuh. Infeksi EBV pada populasi dewasa hampir 95% sehingga sering disebut sebagai *Every Body's Virus*. Sekali seseorang terinfeksi akan terus mengidap virus tersebut seumur hidup. Di negara berkembang dan tingkat sosio ekonomi rendah infeksi EBV lebih sering ditemukan pada orang yang lebih muda (Mitoma, 1990). Dikatakan pula di negara dengan iklim tropis infeksi EBV sering pada usia dini. Setelah infeksi primer virus maka akan berkembang menjadi fase laten. Perkembangan infeksi ini

penting dalam mengakumulasi kerusakan sehingga menjadi pemicu terhadap gangguan regulator kontrol proliferasi dan apoptosis sel (Middeldorp, 2003). Untuk mengungkap mekanisme proliferasi dan apoptosis yang mendasari karsinogenesis KSSRM diperlukan paradigma patobiologi molekuler, maka pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan ekspresi gen yang menyandi supresor tumor dan onkogen antara lain: p53, c-myc dan bcl-2. Diteliti pula ekspresi genom EBV yang menginfeksi KSSRM yaitu EBER, LMP-1 dan EBNA-1.

Walaupun penelitian terhadap Epstein Bar Virus (EBV) sudah banyak terutama keterkaitan dengan Karsinoma Nasofaring (KNF) hampir 95%, namun sampai saat ini, belum banyak dilaporkan keterkaitan dengan KSSRM. Di Indonesia belum pernah dilakukan penelitian tentang KSSRM dengan infeksi EBV. Produk laten EBV adalah *episome* terdiri dari beberapa genom antara lain RNA-EBV (EBER) *Latent Membran Protein-1* (LMP-1) dan *EBV Nuclear Antigen-1* (EBNA-1). Berbagai produk genom ini yang mempunyai peranan terhadap transformasi keganasan (Kief, 1996; Komano and Takada, 2000; Middeldorp, 2003). Higa et al (2002) melaporkan bahwa pada penduduk Jepang yang tinggal di Okinawa 39 orang positif terinfeksi EBV dari 55 kasus KSSRM yang ditemukan. Dilaporkan 18 kasus terjadi karena mutasi EBNA2, sedangkan yang lain karena ekspresi EBNA-1. Mengingat hal itu maka peneliti ingin

mengungkap keterkaitan genom EBV yaitu EBER, LMP-1 dan EBNA-1 terhadap karsinogenesis melalui pendekatan patobiologi molekuler. Perubahan molekuler yang dimaksud adalah ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2

Pemeriksaan EBER pada penelitian ini dimaksudkan untuk menemukan ekspresi EBER pada sel KSSRM dan didapatkan 61,1%. Hal ini hampir sama dengan temuan Gonzales (2002) bahwa pada KSSRM dideteksi EBER sebanyak 19,2%. RNA-EBV (EBER) didasarkan atas EBV yang dikode oleh RNA. Dari hasil penelitian ini nampak bahwa EBER mempunyai nilai rerata yang paling besar dibanding produk genom yang lain. Hal ini dapat dimengerti bahwa EBER pada fase laten akan ditranskripsi dalam jumlah banyak yaitu 10^6-10^7 per sel. EBER mempunyai kemampuan mengaktifkan transkripsi terhadap genom virus yang lain yaitu, *latent membran protein (LMP)* dan *EBV nuclear antigen (EBNA)*. mengingat hal itu maka keberadaan EBER di dalam sel inang akan semakin meningkatkan aktivitas virus. Selain itu EBER berperan terhadap transkripsi dan menghambat apoptosis. Hal ini didukung oleh Komano dan Takada (2000) bahwa ekspresi EBER meningkatkan ekspresi bcl-2.

Pada penelitian ini ditemukan ekspresi LMP-1 pada sel KSSRM sebanyak 47,7%. laporan Gonzales (2002) bahwa pada kasus KSSRM didapatkan 85,7% ekspresi LMP-1. Walaupun tampak

ada perbedaan jumlah pada penelitian ini dengan yang ditemukan oleh Gonzales di Eropa, namun justru keadaan ini merupakan hal yang perlu lebih diteliti. Kemungkinan letak geografis dan genetik memberi gambaran isolat virus yang berbeda. Hal ini sesuai pendapat Degreef (1994) bahwa isolat EBV dipengaruhi oleh faktor genetik dan geografis. Middeldorp (2003) melaporkan pula peran LMP-1 terhadap transformasi keganasan bahwa pada fibroblas *rodent* yang ditransfeksi dengan gen LMP-1 akan berkembang menjadi sel tumor. Peranan lain adalah menghambat apoptosis dengan meningkatkan aktivitas bcl-2 dan menekan sistem imunitas untuk membunuh sel yang terinfeksi tersebut. Mengingat keadaan itu maka LMP-1 akan memicu proliferasi sel dan menghambat apoptosis pada karsinogenesis KSSRM.

Genom EBV lain yang diekspresikan pada sel kanker KSSRM adalah EBV *Nuclear Antigen-1* (EBNA-1) Ditemukan sebanyak rerata 47,7%. Tampak ekspresi ini yang paling kecil dibanding lainnya. Hal ini dapat dipahami karena selama ini ekspresi EBNA-1 dilaporkan hanya didapatkan pada limfoma, leukemia dan karsinoma nasofaring. Hal ini diduga bahwa EBNA-1 memberikan peranan pada beberapa sel dengan karakteristik tersendiri (Hu, 1996). Dengan diketemukan ekspresi EBNA-1 pada KSSRM merupakan hal baru. Gen EBNA-1 ini menyandi faktor transaktivator yang dibutuhkan untuk replikasi DNA, selain itu dapat berikatan dengan RNA melalui

regio pengulangan Gly-Ala. Keberadaan EBNA-1 secara laten akan mempertahankan hidup EBV. EBNA-1 juga akan mengaktifkan faktor transkripsi, baik untuk EBNA-1 sendiri maupun EBNA yang lain, seperti EBNA 2A, 2B (Hu, 1996). Walaupun EBNA-1 adalah protein asing tetapi sulit dinetralsasi oleh sel imun, karena genom virus ini mampu mencegah presentasi epitop bersama MHC-I sehingga tidak mudah dikenali oleh limfosit T. Hal ini menyebabkan EBV bertahan hidup dalam sel inang. Kemampuan lain genom EBNA-1 yang berada laten di dalam inti adalah meningkatkan aktivitas replikasi DNA melalui transkripsi faktor E2F, yang kemudian memodulasi replikasi DNA dengan aktivasi fungsi c-myc.

Gen p53 adalah gen supresor tumor yang mempunyai peran sangat penting terhadap pembelahan sel dan apoptosis. Pada penelitian ini ditemukan ekspresi p53 inaktif pada sel kanker KSSRM sebesar 88%. Hal ini karena bila terjadi infeksi EBV terhadap sel inang yang merusak genom, maka p53 segera menghentikan pembelahan sel atau mengaktifkan apoptosis (Kief, 1996). Dua fungsi utama gen p53 dalam pembelahan sel adalah meregulasi *DNA repair gene* dan *apoptosis gene*. Jika perbaikan gen gagal maka p53 segera menjadi mediator untuk aktivasi gen regulator apoptosis, yaitu famili bcl-2 untuk membuka *pore* pada mitokondria sehingga mengeluarkan cytochrom C dan selanjutnya memicu *cascade caspase*. Pada keadaan infeksi EBV seperti terjadi pada sel

kanker KSSRM gen p53 rusak, menjadi inaktif sehingga pembelahan sel tidak dapat dihentikan dan apoptosis tidak terjadi, hal ini akan memicu karsinogenesis

Pada penelitian ini juga ditemukan ekspresi c-myc pada sel KSSRM yang banyak, yaitu 84%. Ekspresi c-myc berperan sebagai faktor transkripsi untuk replikasi DNA. Menurut Gordon (1985) dan didukung oleh Cantley (1991) bahwa infeksi EBV pada limfosit B akan merangsang secara terus menerus menjadi sel *immortal*. Keadaan ini karena c-myc mengalami translokasi dari kromosom 8 ke 14 (gen imunoglobulin terdapat dalam kromosom 14). Hal ini menyebabkan c-myc yang mengalami translokasi tersebut menjadi aktif sehingga ekspresi berlebihan. Aktivasi onkogen c-myc tersebut berpengaruh terhadap replikasi DNA. Dengan kata lain apabila EBV telah menginfeksi sel epitel skuamus pada rongga mulut maka akan menyebabkan terjadi *over expression* c-myc. Hal tersebut bila terjadi terus menerus akan memicu karsinogenesis. Menurut laporan Cotran (1999) bahwa mekanisme karsinogenesis terjadi disebabkan oleh ketidak-seimbangan antara peran gen tumor supresor dan onkogen serta apoptosis pada pembelahan sel. Infeksi virus merupakan salah satu pemicu terjadi *over expression* c-myc sehingga menimbulkan ketidak-seimbangan tersebut.

Gen bcl-2 adalah salah satu gen yang berperan terhadap karsinogenesis akibat infeksi EBV (Kief, 1996). Pada sel KSSRM

ditemukan ekspresi bcl-2 sebanyak 36% pada penelitian ini. Keterkaitan ekspresi bcl-2 dengan EBV ini sangat besar karena bcl-2 ini pertama kali ditemukan dari isolasi limfoma sel B, yang telah diinfeksi oleh EBV. Hal ini pernah dilaporkan oleh Gordon (1985) dan Hu (1996). Pada penelitian ini ditemukan peningkatan ekspresi bcl-2. Peran ekspresi bcl-2 ini menghambat apoptosis dengan cara menutup *pore* mitochondria sehingga cytochrom C tidak dilepas. Penutupan ini berakibat tidak terjadi *cascade caspase*. Berdasarkan hal tersebut maka peran ekspresi bcl-2 berlawanan dengan p53 (*wild type*). Apabila p53 aktif maka bcl-2 tidak aktif dan diganti oleh gen bax (famili bcl2). Sebaliknya bila p53 inaktif maka bcl-2 menjadi aktif sehingga apoptosis tidak terjadi dan proliferasi berlangsung terus menerus. Keadaan ini yang mendasari terjadi karsinogenesis. Kenyataan tersebut bila terjadi infeksi EBV maka ekspresi bcl-2 menjadi aktif.

Dan hasil temuan penelitian ini ternyata terjadi sebaran yang besar pada ekspresi variabel EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2. Hal ini dapat dilihat pada SD masing variabel yang besar, baik pada kasus KSSRM yang terinfeksi, maupun tidak terinfeksi, dan kontrol. Sebaran Standard Deviasi (SD) yang heterogen diduga karena kntena sampel KSSRM yang berdasar pada pemeriksaan seluler masih belum rinci, sedangkan variabel yang diteliti berdasar pada pemerksaan molekuler. Hal ini yang

mendasari upaya pengelompokan berdasar molekuler (EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif, c-myc, bcl-2).

Berdasarkan pengelompokan KSSRM yang terinfeksi EBV didapatkan kelompok baru 1, 2, 3. Dari ke 3 kelompok baru yang terinfeksi tersebut dan dibandingkan dengan kelompok KSSRM tidak terinfeksi dan kontrol tampak ada perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Mengingat hal itu, maka untuk dapat menjelaskan mekanisme kejadian KSSRM berdasar proliferasi dan apoptosis pada KSSRM terinfeksi maka peneliti melakukan analisis diskriminan. Setelah dilakukan analisis diskriminan didapatkan 5 diskriminator yaitu EBER, LMP-1, EBNA-1, p53 inaktif dan c-myc. Kelima diskriminator ini mempunyai kontribusi yang besar terhadap mekanisme proliferasi dan apoptosis yang mendasari karsinogenesis KSSRM. Berdasarkan diskriminator tersebut didapatkan pola diskriminan untuk membantu menjelaskan mekanisme proliferasi dan apoptosis KSSRM.

Pada kelompok baru-1 (kb-1) KSSRM yang terinfeksi EBV hasil analisis menunjukkan rerata tertinggi adalah c-myc ($44,00 \pm 27,57$) diikuti p53 inaktif ($19,00 \pm 24,24$) dan bcl-2 hanya sedikit ($3,50 \pm 9,44$). Sedangkan genom EBV adalah EBER ($27,00 \pm 18,29$) diikuti LMP-1 ($16,00 \pm 20,11$) dan EBNA-1 ($7,00 \pm 11,60$). Apabila dilihat pada pola diskriminan ("molekuler grading"-1) berdasar ke 5 diskriminator maka diskriminator terkuat adalah EBER (10,07), diikuti c-myc (5,10) kemudian LMP-1 (3,90) dan p53 inaktif (2,052) terakhir

adalah EBNA-1 (0,81). Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut bahwa infeksi EBV pada sel inang akan membawa genom EBV ke dalam sel inang. Genom EBV ini akan mempengaruhi fungsi faktor transkripsi yaitu dengan menghambat peranan I2F sebagai faktor inhibitor transkripsi. Keadaan ini akan mengaktifkan onkogen c-myc sebagai faktor transkripsi. Hal ini terbukti dengan ditemukan ekspresi c-myc yang tinggi. Aktivasi onkogen c-myc oleh EBV ini akan menyebabkan proliferasi berlangsung terus. Ekspresi c-myc akan menekan ekspresi gen p53. Peran p53 yang seharusnya sebagai supresor menjadi inaktif. Dalam penelitian ini terbukti dengan ekspresi p53 inaktif. Akibat dari ekspresi p53 yang inaktif ini akan menekan fungsi p21. Hal ini menyebabkan terjadi *cyclin dependent kinase* meningkat dan terbentuk *cdk-cyclin complex*. Keberadaan *cdk-cyclin complex* akan memicu fosforilasi sehingga pRb inaktif. Hal ini akan mengaktifkan faktor transkripsi E2F dan aktivasi c-myc untuk replikasi DNA, sehingga terjadi proliferasi sel yang hebat. Keadaan ini memperlihatkan peranan yang saling mendukung antara gen supresor tumor dan onkogen terhadap proliferasi sel. Selain itu peran EBNA-1 pada kb-1 ini memicu aktivasi E2F sehingga pembelahan sel terjadi terus menerus. Peranan EBV sebagai inhibitor apoptosis didukung pula oleh ekspresi p53 yang inaktif. Inaktivasi p53 akan memicu penurunan fungsi gen bax (family bcl-2) sebagai proapoptotik. Keadaan ini kemudian transaktivasi terhadap bcl-2.

Aktivasi bcl-2 ini akan menghambat apoptosis sehingga terjadi sel *immortal* dan berkembang menjadi klonal sel kanker akhirnya menjadi kanker. Peran diskriminator bcl-2 pada pola "molekuler grading"-1 yang sedikit (tidak tampak pada pola), karena bcl-2 tidak berperan secara langsung. Variabel lain yang mempunyai peranan adalah ekspresi LMP-1. LMP-1 yang merupakan produk genom EBV mempengaruhi bcl-2. Family bcl-2 (bax) berperan terhadap pengaturan pada *cascade caspase*. Diawali pada lubang membran permeabilitas mitokondria yang membuka kemudian melepaskan cytochrom-c (Finkel, 2001). Family bcl-2 (bcl-2) maka akan menutup pore, sebaliknya kalau tidak aktif akan membuka lubang tersebut. Lubang permeabilitas yang terbuka kemudian mengeluarkan cytochrom-c, selanjutnya mengaktifkan *cascade caspase* sehingga terjadi apoptosis. Pada pola "molekuler grading"-1 ini tampak apoptosis tidak diperankan oleh bcl-2 secara langsung. Hal ini nampak dari ekspresi bcl-2 yang sedikit. Keadaan ini dapat dipahami karena ekspresi LMP-1 lebih sedikit dibanding EBER. Walaupun ekspresi bcl-2 pada penelitian ini secara kuantitas sedikit namun diduga mempunyai kualitas yang tinggi sehingga mempunyai peran terhadap karsinogenesis. Kemungkinan lain bahwa pada pola "molekuler grading"-1 ini peran EBV pada mekanisme proliferasi dan apoptosis pada karsinogenesis KSSRM lebih banyak diperankan oleh ekspresi EBER dan jalur aktivasi melalui onkogen c-myc.

Pada kelompok baru-2 (kb-2) tampak bahwa mekanisme proliferasi dan apoptosis banyak dipengaruhi oleh p53 ($80 \pm 0,00$), c-myc ($26,67 \pm 20,82$), kemudian EBER ($63,33 \pm 20,82$), LMP-1 (40 ± 10) dan diikuti EBNA-1 (20 ± 10). Pada kb-2 ini bcl-2 tidak berperan sama sekali, hal ini tampak pada rerata ($0,00 \pm 0,00$). Hal ini tampak hampir sama dengan kb-1, hanya pada kb-2 ekspresi molekuler jauh lebih tinggi dibandingkan pada kb-1. Dengan kata lain bahwa pada kb-2 terjadi proliferasi yang sangat tinggi. Keadaan ini dapat dipahami karena infeksi EBV melalui EBER dan EBNA-1 jauh lebih tinggi pada kb-2, demikian pula ekspresi LMP-1 lebih banyak didapatkan pada kb-2. Ekspresi c-myc pada kb-2 lebih rendah dibanding kb-1. Hal ini dapat dipahami karena peranan proliferasi pada kb-2 lebih banyak diperankan oleh tumor supresor gen yaitu ekspresi p53 inaktif. Walaupun ekspresi bcl-2 tidak tampak pada kb-2 ini namun mekanisme proliferasi tetap tinggi. Berdasarkan pola diskriminan-1 ("molekuler grading"-1) tampak bahwa mekanisme proliferasi dan apoptosis disebabkan oleh ekspresi p53 inaktif. Diduga karena peran p53 inaktif lebih besar dibanding bcl-2. Pendapat Komano and Takada (2000) kerja bcl-2 dipengaruhi oleh p53. Selain itu ekspresi EBV yang sangat tinggi pada penelitian ini telah merusak fungsi p53, sehingga ekspresi p53 inaktif menjadi tinggi. Inaktivasi p53 akan menyebabkan terjadi pembelahan sel yang terus menerus. Keadaan ini yang memicu progresivitas

proliferasi sel kanker menjadi tinggi. Ekspresi genom LMP-1 yang tinggi pada penelitian ini secara tidak langsung menginduksi reseptor CD21. Semakin banyak dibentuk reseptor CD21 maka bertambah banyak terjadi infeksi EBV. Hal ini menyebabkan virus semakin *survive* dan bereplikasi. Replikasi virus yang terus menerus ini menyebabkan kerusakan p53 semakin banyak sehingga meningkatkan ekspresi p53 inaktif. Ekspresi P53 inaktif yang tinggi ini menyebabkan akumulasi mutasi genetik semakin banyak. Selain itu kemampuan LMP-1 mengubah sel normal menjadi sel kanker dan mencegah presentasi antigen pada MHC1 menyebabkan proliferasi sel kanker semakin banyak dan virus bertahan dalam sel inang. Keadaan yang saling mendukung antara molekuler, baik ekspresi genom EBV maupun ekspresi genom pembelahan sel yaitu p53 inaktif akan memicu karsinogenesis KSSRM.

Pada kelompok baru-3 (kb-3), ekspresi p53 ($40,00 \pm 14,14$) walaupun tinggi, namun masih jauh lebih rendah dibandingkan kelompok baru 1 dan 2, kemudian disusul ekspresi bcl-2 ($17,50 \pm 35,00$), c-myc ($10,00 \pm 11,55$). Infeksi EBV ditunjukkan oleh ekspresi EBNA-1 ($30,00 \pm 0,00$). Walaupun pada kb-3 (tabel 3) ditemukan ekspresi EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 namun setelah dilakukan analisis diskriminan ternyata hanya ekspresi EBNA-1 yang berperan. Pendapat King (2000) bahwa p53 adalah *Guardian of genom*. Apabila terjadi gangguan pada genom maka p53 segera

bertindak. Pada pola diskriminan-3 ("molekuler grading"-3) tampak bahwa ekspresi p53 inaktif, c-myc dan bcl-2 tidak berperan. Keadaan ini diduga karena infeksi EBV hanya diperankan oleh ekspresi EBNA-1, sedangkan EBER dan LMP-1 tidak diekspresikan. Ekspresi EBNA-1 lebih banyak mempengaruhi faktor transkripsi E2F. Dengan kata lain bahwa mekanisme proliferasi dan apoptosis lebih banyak melalui E2F. Selain itu dugaan lain, dengan tidak ada peran p53 inaktif pada penelitian ini, maka fungsi p53 masih baik sehingga dapat berperan secara normal sebagai supresor tumor. Keadaan yang demikian ini diduga bahwa pada kb-3 mekanisme karsinogenesis masih dalam tahap dini.

Pada kelompok KSSRM yang tidak terinfeksi, berdasar nilai rerata tidak ditemukan ekspresi genom EBV, namun juga terjadi mekanisme proliferasi dan apoptosis walau lebih rendah. Pada kelompok ini didapatkan ekspresi p53 inaktif ($21,88 \pm 15,10$), c-myc ($19,38 \pm 19,72$) dan bcl-2 ($7,50 \pm 4,63$). Keadaan ini bisa dipahami karena pada kelompok KSSRM yang tidak terinfeksi tidak ada kontribusi EBV. Walaupun tidak ada kontribusi EBV namun perlu diwaspadai karena mekanisme proliferasi dan apoptosis kemungkinan disebabkan oleh faktor lain. Berdasarkan pola diskriminan ("molekuler grading") didapatkan ekspresi p53 inaktif dan c-myc yang memberi kontribusi terhadap mekanisme proliferasi dan apoptosis. Bila dibandingkan pada kelompok KSSRM yang terinfeksi

EBV masih lebih rendah. Hal ini perlu mendapat perhatian dan penelitian lebih lanjut.

Berdasar gambaran kiinis KSSRM yang terinfeksi EBV yang ditemukan pada penelitian ini (Lampiran 2) bila dikaitkan dengan kelompok baru hasil temuan peneliti, maka pada kb-2 lebih banyak terjadi pada KSSRM dengan *staging* 2 dan sebagian *staging* 3. Hal ini bisa dipahami karena pada kb-2 terjadi mekanisme proliferasi dan apoptosis yang paling tinggi dibanding kb yang lain. Pada kb-1 dan kb-3 lebih banyak pada *staging* 1 dan beberapa pada *staging* 2. Keadaan ini dapat dijelaskan sebagai berikut pada kb-3 tersebut merupakan awal penyimpangan mekanisme proliferasi dan apoptosis pada karsinogenesis KSSRM. Kemudian berkembang menjadi kb-1 dan akhirnya menjadi kb-2.

Bila kelompok baru KSSRM yang terinfeksi EBV dikaitkan dengan *grading* histopatologi KSSRM pada kb-3 lebih banyak terjadi dengan *grading Well differentiated*. Demikian pula pada kb-1 lebih banyak *Well differentiated*. Bila dilihat pada kb-2 lebih banyak ditemukan pada *Moderately differentiated* dan *Poorly differentiated* walaupun masih ditemukan juga sebagian dengan *Well differentiated*. Hal ini mengungkapkan bahwa pola "molekuler *grading*" dapat membantu mendinikan diagnosis.

Untuk mendapatkan *range* (batas minimal dan batas maksimal) pada pola proliferasi dan apoptosis maka dilakukan

analisis *multivariate cut-off*. Pada pola "molekuler grading"-1 didapatkan *multivariate cut-off* dengan *range* 4,4630 – 12,6002. Pada pola "molekuler grading"-2 dengan *range* 17,3864 – 61,3809. Pola "molekuler grading"-3 dengan *range* –0,9805 – 3,8588.



BAB 7

SIMPULAN DAN SARAN

7.1 Simpulan

1. Pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi Epstein - Barr Virus (EBV) ditemukan RNA-EBV (EBER), dan ekspresi *Latent Membrane Protein-1* (LMP-1) serta *EBV Nuclear Antigen-1* (EBNA-1).
2. Melalui paradigma Patobiologi Molekuler ditemukan kelompok baru mekanisme kejadian karsinoma sel skuamosa rongga mulut yaitu kb-1, kb-2 dan kb-3 berdasarkan EBER, LMP-1 EBNA-1, p53 inaktif, c-myc dan bcl-2.
3. Mekanisme kejadian KSSRM, didasarkan pada peran infeksi EBV (EBER, LMP-1, EBNA-1) terhadap perubahan onkogen dan gen supresor yang bertanggung jawab terhadap proliferasi dan apoptosis sel yang terdiri atas: p53 inaktif, c-myc dan bcl-2. Pada KSSRM dengan ekspresi genom EBV tinggi, maka terjadi peningkatan ekspresi gen p53 inaktif, c-myc dan bcl-2.
4. Pola diskriminan "molekuler grading" dapat membantu mendinikan diagnosis KSSRM yang terinfeksi EBV.

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, C., Sengupta, S.K., Aedes, C., Moss, D.J. and Scully, T.B. (1994) Heterogeneity within The Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 Gene in Different Strain of Epstein-Barr Virus. *J. Gen. Virol* 75: 95-100.
- Adams, J.M and Cary S. (1998). The Bcl-2 Protein Family Arbiters of cell Survival. *Sciences*, 281: 1322-1326.
- Allegranca A, Girlando S, Amgioni GL, Veronesse S, Mauri FA, Gambarcota M, Pollo B et al (1991). Proliferating cell nuclear antigen expression in central nervous system neoplasm. *Virchows Archiv. A. Pathol. Ana*; 419: 417-23
- Ashkenazi, A and Vishva, M.D (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* Vol.281 (28) August: 1301 – 1308.
- Babcock GJ, Decker Lisa L, Freeman RB and Thorley-Lawson DA (1999). Epstein-Bar Virus-Infected Resting Memory B Cells, not Proliferating Lymphoblast Accumulate in the Peripheral Blood of Immunosuppressed Patients. *J. exp. Med* 190 (), August 16: 567-76.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Sequin, C., Tuffnell, P.S. and Barrel, B.G. (1984). DNA Sequence and Expression of The B95-8 Epstein-Barr Virus Genome. *Nature*. 310: 207-211.
- Bhisop JM (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, 64: 253-48
- Boulter A, Johnson N.W, Bimbaum, W. and Teo C.G. (1996). Epstein-Barr Virus (EBV) Associated lesions of the head and neck. Guest editorial. *Oral Diseases*.2: 117-124.
- Bratton Shawn B and Gerald M. Cohen (2001). Apoptotic death sensor: an Organelle's alter ego. *Pharmacol Sciences*. Vol. 22 (6). 306-315
- Brodeur, S.R., Cheng, G., Baltimore D. and Thorley-Lawson, D (1997) Localization of Major NF- κ B Activating Site and the Role TRAF 3 Binding Site of LMP-1 Defines Two Distinct Signaling Motifs. *J. Biol Chem* 272: 19771-19784

Brooks DJ, Gerewal HS (1992). Measures of tumor proliferative activity, *Int J. Clin. Lab. Res*, 22: 196-200.

Budhy, T.I (1995). Analisis tumor Ganas Rongga Mulut di Jawa Timur. Edisi Journal Kongres PDGI ke XIX, Balikpapan : 131-143.

Budhy, T.I.; Soenarto, SD; Yaacob, HB and Ngeow, WC (2001) Changing incidence of oral and maxillofacial tumours in East Java, Indonesia 1987-1992. *British Journal of Oral and maxillo. Surg* : 210-213.

Cantley, LL; Auger KR; Carpenter, C; Duckwoth B; Gaziani A; Kapeller, R and Soltoff, S. (1991). *Oncogenes and Signal Transduction*, 64 : 281-302.

Chong VFH and Tsao SY (1996). *Nasopharyngeal Carcinoma*. Armour Pub Pta. Ltd. Singapore: 14 – 23.

Cohen JJ (1991). Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol*; 179: 1789-94.

Cotran, R.S ; Kumar, V and Collins T (1999). *Pathologic Basic of Disease*, 6th ed. Philadelphia. WB. Saunders Co : 260 – 328.

Constantini, P; Jocotot, E; Decandin D. and Kroemer, G (2000). Mitochondrian as Novel Target of Anticancer Chemotherapy. *Journal of National Cancer Institute*, vol.92 (13), July : 1042-1053.

CMGS (1998) Tumor Supressor Gene in MR Path Course-cancer genetics AA, 24/09/98 diakses dari www.ich.bpmf.ac.uk.

Cruz, I; Van Den Brule, Brink, AA; Snijders, PJ; Walboomers; Vander wall I and Meijer CJ (1999) No Direct role for EBV in oral carcinogenesis a study at the DNA, RNA and protein level. *Int J Cancer*, May 1, 85 (3): 356-61.

Cruz, I; Van den Brule, R.D.M. Steenbergen, P.J.F. Snijders, C.J.L.M. Meijer, J.M.M. Walboomers, G.B. Snow and I. Van der Waal (1997) Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa-a study using polymerase chain reaction. *Oral Oncology, Ueropean Journal of Cancer*, 33, 182-188.

Daili S.F. Indriatmi W (2002) *Infeksi Virus Herpes*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

de Bruin PC, Jiwa NM, van der Valk P, et al. (1993). Detection of Epstein – Barr virus nucleic acid sequences and protein in nodal T-cell lymphomas. Relationship between LMP-1 positivity and clinical course. *Histopathology*. 23: 509-18.

Degreef H and the Famciclovir Herpes Clinical Study Group (1994). Famciclovir, a new oral antiherpes drugs. results of the first controlled clinical study demonstrating its efficacy and safety in the treatment of uncomplicated herpes zoster in immunocompetent patients. *Int J Antimicrob Agent*: 4: 241-6.

Dukers DF, Jaspers LH, Hayes D, et al. (2000). Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles and T-cell infiltrate in Epstein-Barr virus positive and negative cases of Hodgkin's disease. *J Pathol*. 190: 143-9.

Fearon, ER (1995). Molecular genetic studies of colorectal tumorigenesis. *Proceeding of 31st annual meeting of American Society of clinical oncology*, Los Angeles California, May, 20-23

Fesik Stephen, W and Shi Yigong (2001) Controlling the caspases. *Science*. vol.24 November 16 : 1477-1478.

Finkel (2001). The mitochondrion: is it central to Apoptosis. *Science*, April (292): 624-626

Fruehling, S, Swart, R, Oolwick, K, Kremmea, E and Longnecker R (1998). Tyrosine 112 of latent membrane protein ZA is Essential for protein Tyrosine Kinase Loading and Regulation of Epstein-Barr Virus Latency, *J of virology*, Oktober, 72 (10) : 7796-7806.

Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, et al (1999). Latent membrane protein-1 of Epstein Barr – virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18: 3064-73

Gondhowiardjo S. (1998) Faktor Prediksi respon radiasi pada kanker nasofaring. Tinjauan kasus pada aktifitas proliferasi dan ekspresi LMP1, EBV. *Disertasi*. PPS FK UI, Jakarta.

Gondhowiardjo S (2000). Perangai Spontan Apoptosis pada Karsinoma Nasofaring: Hubungannya dengan pertumbuhan dan sensitivitas tumor terhadap radiasi. *Laporan Risbin Iptek Dok V*.

Gonzales, M, Gutierezz, Rodriquez, Avila Rand Archilla R (2002). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 (LMP-1) Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma *Laryngoscope* 112 (3): 482-87.

- Gordon, H (1985). *Oncogenes Mayo Clinic Proc*, 60 : 697-713.
- Green DR (1998). *Apoptotic pathways: Road to ruin. Cell*, 94: 695-98.
- Habeshaw G, YAO Q.Y, Bell A.I, Morton D. and Rickinson A.B. (1999). *Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Sequences in Endemic and Sporadic Burkitt's Lymphoma Reflect Virus Strains Prevalent in Different Geographic Areas. Journal of Virology*, Feb, 965-975.
- Hanahan D and Robert A.Weinberg (2000). *The Hallmarks of cancer. Cell*, 100 (7): 57-70
- Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, et al (1993). *Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: Arrested development and cell death. Cell*; 72: 325-9.
- Haryana Sofia Mubanka (2002). *Course and Workshop. Basic Sciences in Oncology. Modul A. Indonesian Society of Oncology. RS Darmais, Jakarta, 29 Juli.*
- Hashimoto F, Oyaizu N, Kalyanaraman VS, Pahwa S (1997). *Modulation of Bcl2 protein by CD4 cross-linking: A possible mechanism for lymphocyte apoptosis in human immunodeficiency virus infection and for rescue of apoptosis by interleukin-2 Blood*, 90(2): 745-53.
- Hsieh; Kietsas, D, Clunn, G; Hughes, AD; Schachter, M and Mason (2000). *P53, p21 and MDM2 involvement in the proliferation and Apoptosis in an in vitro Model of Conditionally Immortalized Human vascular smooth muscle cell. Arteric Thromb vasc Biol*, 20 : 973-981.
- Hsieh Ling-ling, Pei Feng Wang, 1-How chen, Chun-Ta Liao, Hung-Ming Wang, Ming Chi-chen, Joseph Tung Chieh Cheng and Ann-Joy Cheng (2001). *Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese carcinogenesis. 22 (9) : 1497-1503.*
- Higa, M; Kinjo T; Kamiyana K; Iwamasa T; Hamada T and Iyama K (2002). *Epstein-Barr Virus Subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in okinawa, a subtropical island in southern Japan, Compared with kitakyusu and kumamoto in mainland japan. J.Clin Pathol*, 55 : 414-423.
- Higgins JE. (1985). *Design Methodology for Randomized Clinical Trial, Family Health International, North Caroline: 27-32.*

Hu, Li Fu (1996). **Nasopharyngeal Carcinoma and Epstein – Barr virus**. Microbiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institute, Stockholm. 15-25.

Hu, L.F, Chen, F., Zhen, Q.F, Zhang, Y.W, Luo, Y, Zheng, X, Winberg, G, Ernber, I and Klein, G (1995) Differences in the Growth Pattern and Clinical Course of EBV LMP-1 Expressing and Non-expressing Nasopharyngeal Carcinoma. *Eur J. Cancer*. 31A: 658-660.

Israel MA (1996). Molecular genetics in the management of patients with cancer. In Bishop JM and weinberg Ra (eds). **Molecular Oncology**. New York. Scientific American Inc, 205-236.

Ito, R; Yasui.W; Ogawa. Y; Toyosawa, S; Tahara, E and Ijuhin (1999). Reduced Expression of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27 in Oral Malignan Tumor. *Pathobiot*, 67 . 169-173.

Kastan B.M. (1997). **Molecular Biology of Cancer The Cell Cycle dalam Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. Cancer. Principles and practice in oncology**. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1997: 121-134.

Kawasaki, H; Onuki, R; Suyama, E and Taira K. (2002). Identification of Genes That function in the TNF- α mediated apoptotic pathway using randomized hybrid ribozyme libraries *nature bio*,20, (4) : 376-396

Kief, Elliot (1996). **Epstein Barr Virus and its Replication**. Dalam Fields, B; Kriipe, D; Howley, P; Chanock, R, Melnick, J; Monath, T; Roizman B and Strans, Stephen (1996). *Vitology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia : 2343-2446

King, Roger JB (2000). **Growth : a Balance of proliferation, death and differentiation in cancer Biology**. 2nd ed. Prentice Hall : 146-170.

Komano Jun and Kenzo Takada (2001) Role of bcl-2 in Epstein-Barr Virus-induced malignant conversion of Burkitt's Lymphoma cell line Akata. *J of Virology*, Feb, 1561-1564.

Kusick, VA (1989). **Mapping and sequencing the human genome** *NEJM* 320. 910-915.

Lagenaur L and Paletsky (1999) Regulation of EBV promoters in Oral Epithelial cells and lymphocytes. *J of virology*, 73 (8) Aug . 6566-6572.

Laing KG, Matys V, Clemens MJ. (1995). Effects of expression of the Epstein – Barr virus small RNA EBER-1 in heterologous cells on protein synthesis and cell growth. *Biochem Soc Trans.* 23:311S.

Lee, W.H (1993). Tumor Suppressor Genes: The hope. *Faseb* : 819-20.

Levine AJ (1995). Tumor Suppressor Genes. *Science and Medicine*, 28-37.

Liebowitz D (1996). Epstein – Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. *New Engl J Med.* 338: 1413-21.

Lowe W. Scott and Lin, W Athena (2000) apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21 (3) : 485-495.

Maies G; Galindo P; Gutierrez J; Archilla R, Avilla R, Fernandez E. (2000) Expression of p53 protein in Oral Squamous cell carcinoma associated with EBV. *Microbios*, 102 (403) : 147-54.

Makin Guy and Dive Caroline (2001) Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Bio* 11 (11) Nov. 522-526.

Mehl AM, Floettmann JE, Jones M, Brennan P, Rowe M. (2001). Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein – Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa B to activate transcription. *J Biol Chem.* 276: 984-92.

Mendelson J, Howley P.M, Israel M and Liotta L.A. (1995). Tumor Suppressor Genes. In the *Molecular Basis of Cancer*. Edited by WB Saunders Co, Philadelphia: 86-100.

Middeldorp JM, Antoinette ATP, Brink, Adrian J.C van den Brule and Chris J.L.M Meiger (2003). Pathogenic roles for Epstein – Barr virus (EBV) gene products in EBV – associated proliferative disorders. *Oncol – hematology.* 45. 1-36.

Mitoma Diaz F, Sibbald RG, Shafran SD, et al (1990). Oral famciclovir for the suppression of recurrent genital herpes: a randomized controlled clinical trial. Collaborative Famciclovir Genital Herpes Research Group. *JAMA*; 280: 887-892.

Moles, G; Galinde, P; Gutierrez, J, Rodrigues, A, Ruiz A and Sanchez, FE (2000). Expression of the p53 protein in OSCC associated with EBV. *Microbios*, 102 (403): 147-54.

Mudigdo (2002). Peran p53, prb dan c-myc dalam aktivitas proliferasi sel pada kanker serviks uteri dengan infeksi HPV type 16 dan 18. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya: 38-41.

Murray RK. (2000). Cancer, cancer genes and Growth Factors. Dalam Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds). *Harper's Biochemistry*, 25th ed. Apleton and lange.

Nicholson, L J , Hopwood, P., Johannessen, J., Salsbury, J.R., Codd, J., Thorley-Lawson, D. and Crawford, H (1997). Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein does not inhibit differentiation and induces tumorigenicity of human epithelial cells. *Oncogenesis*. 15: 275-283.

Nowel PC (1988). Molecular events in tumor development *NEJM* 319: 910-915.

Perkins AS, Stern DF (1997). *Molecular Biology of Cancer. Oncogeneses*. Dalam Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer. Principles and practice in oncology*. Philadelphia: JB Lippincott Co. 79-102

Peters Edwards S (2002). Edemiology of Oral cancer. Dalam www.hsph.harvard.edu.collaboative Study of Head and Neck Disease at HSPH. Diakses tanggal 21-8-2002.

Putra S.T. (1997). *Biologi Molekuler Kedokteran, Edisi Pertama*, Airlangga University Surabaya Press, Surabaya, Indonesia: 59-89.

Rawlins DR, Mitman G, Hayward SD, Hayward GS. (1985). Sequence specific DNA binding of the Epstein – Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*. 42: 859-68

Reed JC (1997). Bcl2 family proteins: Regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin in Hematol*; 34: 9-19.

Reed JC (1999). Mechanism of apoptosis avoidance in cancer. *Current Opinion Oncol*; 11: 66-75

Rowe M, Young L S, Cadwallder K, Petti L, Kieff E and Rickinson A.B (1989). Distinction between Epstein-Barr Virus Type A (EBNA 2A) and Type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of Nuclear Proteins. *J. Virol* 63.3: 1031-1039.

Saito, I, Serenius, BO; Compton, T and Fox Robert (1989). Detection of EBV DNA by PCR in Blood and Tissue Biopsies from patients with sjorgen syndrome. *J Exp Med*, 169, (6) : 2191-2198

Schaller, B (1997). New Gene Jints at Family Behind Previously Singular Tumor Suppressor. In Harvard Researchers Report Deppelganger. Di akses di www.hms.harvard.edu pada tanggal 19-07-2002

Schroeder, H (1991). Oral Structural Biology, New York, Thieme Medical Publishern Inc : 350-385.

Selleri C, Maciejewski JP, Pane F, et al (1998). Fas mediated modulation of BCR/ABL in chronic myelogenous leukemia results in differential effects on apoptosis. *Blood*, 92 (3): 981-89.

Shao, J Y.; Ernberg, I; Biberfeld, P; Heiden T, Liang Wu; Xinzeng and Li-Fuhu (2002) Interaction of Tumor cells Leucocytes and Expression of EBV LPMi in Nasopharyngeal Carcinoma In EBV 2002 in Australia, 16-20 Juli 2002.

Sharp TV, Raine DA, Gewert DR, et al. (1999). Activation of the interferon-inducible (2' – 5') oligoadenylate synthetase by the Epstein Barr virus RNA EBER-1. *Virology*, 257: 303 – 13.

Shimakage, M; Horri, K; Tempaku, A; Kakudo, K; Shirosaka, T and Sasagawa T (2002). Association of EBV with oral cancers. *Hum Pathol*, Jun, 33 (6) :608-614.

Sudjadi (2002) Teknik Biologi Molekuler. Kursus Imunologi dan Biologi Molekuler Pusat Kedokteran Tropis. Universitas Gajah Mada Yogyakarta, 15 Juni: 31-56.

Suzuki A, Obata S, Hayashiba m, et al (2001). SADS: Anew component of Fas-DISC is the accelerator for cell death signaling and is down regulated in patients with colon carcinoma. *Nature Med*, 7 88-93.

Swaminathan Sankar, Tomkinson Blake and Kieff Elliot (1991). Recombinant Epstein-Barr Virus with small RNA (EBER) genes

deleted transforms lymphocytes and replicates *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci, Feb (88). 1546-1550.

Takahashi H. A (2001) A SADS defect in tumor cells provide optimism. Nature Med, 7: 26-27.

Tan X and Wang JYJ. (1998). The caspase-RB connection in cell death. Trends in Cell, Biol, 8: 116-20

Tyalar SS, Knighton DR, Zheng J, et al. (1992) Structural framework for the protein kinase family. Ann Rev Cell Biol. 8: 429-62.

Tubiana M Courdi (1989) cell proliferation Kinotics in human solid tumor, relation to probality of metastatic dissemination and long-term survival. Radiotherapy and Oncology, 15 : 1-18.

Wang, F , Gregory, C, Sample, C., et al. (1990) Epstein-Barr virus Latent Infection Membrane and Nuclear Protein 2 and 3C are Effector of Phenotypic Changes in B Lymphocyte: EBNA 2 and LMP Cooperatively Induce CD 23. J. Virol. 64: 2309-2318

Wasito R, 1991. Penggunaan Imunositokimia untuk diagnosis Penyakit. Kursus singkat Imunositokimia di PAU Universitas Gajah Mada, Yogyakarta

Weinberg RA and Hanahan D (1996). The molecular pathogenesis of cancer. In: Bishop JM and Weinberg RA (eds) Molecular oncology New York, Scientific American; 179-204

Willie, A (1998). Cell Death in Apoptosis and cell proliferasi, 2nd ed, Boehringer Mannheim . VI-VII.

Whittaker JA, Delamore IW (1987). Leukemia 1st ed. Blackwell Sc Publ, Oxford.

Wijayanti N (1999). Analisis Tipe Virus Epstein – Barr Penderita Karsinoma Nasofaring di Di Yogyakarta. Tesis. PPS UGM. Yogyakarta. 4-6.

Wong B and Choi Y (1997) Pathways leading to cell death in T cells Current opinion in Immunol, 9. 358-64.

www.cancer.bham.ac.uk. Epstein-Barr Virus, cancer Research UK institute for cancer studies. diakses tgl. 21-8-2002

www.uwo.ca. The cause of cancer in Neoplasia diakses tgl.21-8-2002

Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N.
(2000). Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by
Epstein – Barr virus-encoded RNAs. *FEBS Lett* 484: 153-8.





SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : SUGIANTI
Umur/Jenis kelamin : 30 TH / PEREMPUAN
Alamat : JL. PAHLAWAN 201 TULUNGABANG
Pekerjaan : SWASTA

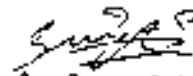
Dalam hal ini bertindak atas nama sendiri/suami/isteri/keluarga, menyatakan tidak keberatan diperiksa kelainan di rongga mulut untuk keperluan penelitian berjudul:

"MEKANISME KEJADIAN KARSINOMA SEL SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) BERDASAR EKSPRESI p53, c-myc DAN bel-2"

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kelainan di rongga mulut berupa tumor yang terkait dengan *Epstein-Barr Virus*.

Saya menyetujui bahwa catatan medis dan laboratoris saya dicatat serta diikutsertakan dalam penelitian oleh Theresia Indah Budhy S, drg, MKes sebagai kandidat doktor Program Pascasarjana Unair, NIM. 090013729/D dengan promotor Prof Dr Roemwerdiniadi S, dr, SpPA. Penelitian ini dilaksanakan dalam rangka menyelesaikan disertasi pada pendidikan Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Sifat, tujuan, dan maksud penelitian ini sudah dijelaskan dan telah saya pahami.

Surabaya, 2004
Yang menyetujui,


SUGIANTI

Mengetahui:

Dokter Bagian Bedah Kepala dan Leher
RSU Dr Soetomo



Promotor


(Prof Dr Roemwerdiniadi S, dr, SpPA)



Gambaran Klinis Penderita Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut Periode 2002 S/D 2003

No.	Diagnosa	Umur		Lokasi	Grading	Staging	Suku	Higienis mulut/ Faktor Predisposisi	Sosial Ekonom/ Pengetahuan tentang Kanker	Kebiasaan	Kelompok Baru
		U	P								
1.	KSSRM	45		Lidah	Well dif.	T ₁ N ₂ M ₀	Jawa	Sedang/Sariawan	PN/cukup	Rokok (-)	2
2.	KSSRM	68		Lidah	Well dif	T ₂ N ₁ M ₀	Madura	Buruk/Benjolan	Swasta/kurang	Rokok (+)10 bt tiap hari	2
3.	KSSRM		47	Lidah	Poorly dif	T ₄ N ₁ M ₀	Jawa	Buruk/Sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	2
4.	KSSRM		37	Lidah	Well dif	T ₂ N ₁ M ₀	Jawa	Sedang/-	Ibu RT/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	2
5.	KSSRM	69		lidah	Well dif	T ₂ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/-	Swasta/cukup	Rokok (-) Alkohol (-)	1
6.	KSSRM	44		ant lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/ anatomi lidah tidak baik, tergigit	Swasta/kurang	Rokok (-) Alkohol (-)	1
7.	KSSRM	44		lidah lar	Well dif	T ₁ N ₁ M ₀	Jawa	Sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-) Alkohol (-)	1
8.	KSSRM	51		lidah	Well dif	T ₂ N ₁ M ₀	Jawa	Buruk/-	Swasta/kurang	Rokok (-) Alkohol (-)	1

No.	Diagnosa	Umur		Lokasi	Grading	Staging	Suku	Higienis mulut/ Faktor Predisposisi	Sosial Ekonomi/ Pengetahuan tentang Kanker	Kebiasaan	Kelompok Baru
		L	P								
9.	KSSRM	42		Lidah	Well dif	T ₁ N ₂ M ₀	Jawa	Buruk/Sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-) Alkohol ()	2
10	KSSRM		61	bukal	Well dif	T ₃ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/Sariawan	Ibu RT/kurang	Rokok () Alkohol (-)	Tidak infeksi
11.	KSSRM	63		Lidah	Poorly dif	T ₂ N ₂ M ₁	Jawa	Buruk/Gigi tajam	Swasta/kurang	Rokok (-)	1
12.	KSSRM		52	Palatum	Poorly dif	T ₄ N ₀ M ₁	Jawa	Sedang/Berjalan	Ibu RT/kurang	Rokok Alkohol ()	1
13.	KSSRM	51		Lidah	Well dif	T ₁ N ₁ M ₀	Jawa	Buruk/Sariawan	Swasta/kurang	Rokok Alkohol (-)	1
14.	KSSRM	44		Lidah	Moderat dif	T ₂ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/Sariawan	Ibu RT/kurang	Rokok Alkohol ()	3
15.	KSSRM	69		Lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sariawan	Swasta/kurang	Rokok Alkohol (-)	3
16.	Invasiv KSSRM	56		lidah lateral s/d dsr mulut	Well dif	T ₂ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/gigi (-)	Swasta/kurang	Rokok Alkohol (-)	3
17.	KSSRM Invasiv	74		dorsum lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Buruk/Sariawan	Swasta/kurang	Rokok Alkohol ()	Tidak infeksi

No.	Diagnosa	Umur L . P	Lokasi	Grading	Staging	Suku	Higienis mulut/ Faktor Predisposisi	Sosial Ekonomi/ Pengetahuan tentang Kanker	Kebiasaan	Kelompok Baru
18.	KSSRM	47	lidah 2/3 s/d mand KGB submand	Moderat dif	T ₂ N ₁ M ₀	Jawa	Buruk/iritasi gigi	Ibu RT/kurang	Rokok (), Alkohol (-)	Tidak infeksi
19.	KSSRM invasiv	50	mukosa labial	Well dif	T ₂ N ₀ M ₀	Madura	Buruk/tergigit, anatomi gigi	Swasta/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	Tidak infeksi
20.	KSSRM infiltrat	37	dorsum lidah	Moderat dif	T ₂ N ₁ M ₀	Jawa	Buruk/sariawan	Ibu RT/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	2
21.	KSSRM	44	lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/sariawan	Swasta/kurang	Rokok (), Alkohol (-)	3
22.	KSSRM	69	lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	Tidak infeksi
23.	KSSRM	42	lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	Tidak infeksi
24.	KSSRM	55	palatum	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/sariawan	Swasta/kurang	Rokok (). Alkohol (-)	Tidak infeksi
25.	KSSRM	42	lidah	Well dif	T ₁ N ₀ M ₀	Jawa	Sedang/sariawan	Swasta/kurang	Rokok (-), Alkohol (-)	Tidak infeksi



PROSEDUR KERJA INSITU HYBRIDIZATION

<i>Rehydration</i>	Celupkan slide yang berisi potongan jaringan ke dalam xylene	2 x 5 menit
	- Celupkan pada etanol 99%	2 x 3 menit
	Celupkan pada etanol 95%	2 x 3 menit
	Keringkan dalam udara suhu kamar	~ 5 menit
	- Lapsi jaringan dengan ditetes DAKO Pen Kode S 2002	dua kali setiap kali ganti bahan 2 x 3 menit
- Celupkan pada air yang berada dalam toples (toples harus bebas dari Rnase)	3 menit	
<i>Pretreatment untuk fragmentasi DNA/RNA</i>	- Letakkan slide dalam chamber (gunakan sarung tangan bersih)	
	- Menggunakan proteinase K, sebelumnya dibuat larutan (vial no1) dengan perbandingan 1 : 10 dalam TBS , atau dibuat dulu dengan cara teteskan 10 tetes vial no. 1 (500 µl) dalam 4,5 ml TBS	
	- Tetesi 150 µl larut proteinase K pada tiap-tiap bagian	
	- Inkubator	20-30 menit
	- Celupkan slide dalam air	2 x 3 menit
- Celupkan slide dalam ethanol 95%	~ 10 detik	
- Celupkan slide dalam chamber	~ 5 menit	
<i>Hybridization</i>	- Tambahkan 1-2 tetes fluorescein-conjugated PNA probe ke jaringan, pada tempat yang terpisah, tambahkan kontrol probe (vial no. 2 dan 3) hanya untuk kontrol (-) dan (+) !	
	Tutup slide dengan cover slip Letakkan air di dalam chamber sebelum meletakkan slide dalam inkubator (untuk mencegah kekeringan)	
	Letakkan chamber dalam inkubator	1 ½ jam, 55°C
- Lepaskan cover slip		
- Panaskan <i>stringent wash solution</i> , vial no 4		

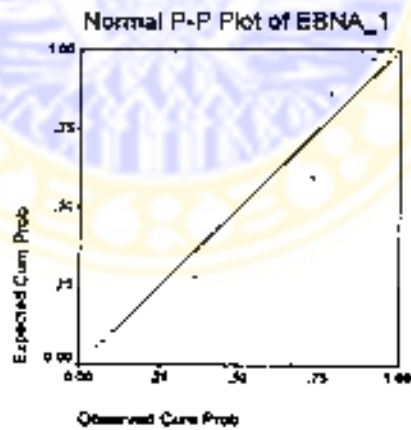
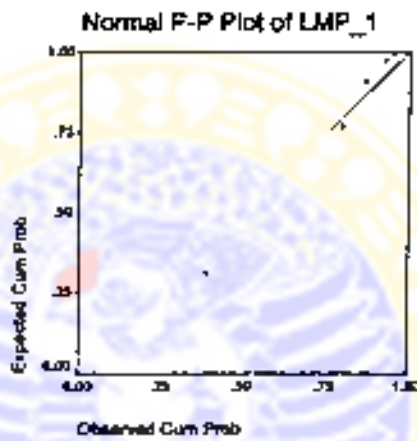
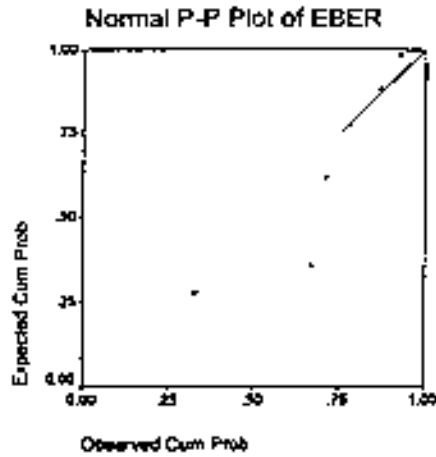
	Celupkan slide dalam larutan <i>stringent wash solution</i> yang telah dipanaskan	25 menit, 55°C dengan digoyang dalam shaker : 10 detik
	- 1 slide ditetesi 100 µl celupkan slide dalam larutan <i>stringent wash solution</i> yang telah dipanaskan	
Detection	- Letakkan slide dalam chamber - Tambahkan 2-3 tetes Anti FITC/AP vial no 5 dalam tiap bagian	
	Inkubasi	30 menit
	Celupkan slide dalam TBS	2 x 3 menit
	Celupkan slide dalam air	2 x 1 menit
	- Letakkan slide dalam chamber - Tambahkan 2-3 tetes substrat, vial no 6 dalam tiap bagian	
	- Inkubasi	30-60 menit
	- Celupkan slide dalam air kran	5 – 10 detik
Counterstaining and mounting	- Cat dengan haematoxylin - Mounting dalam glycergel No. C 0563	

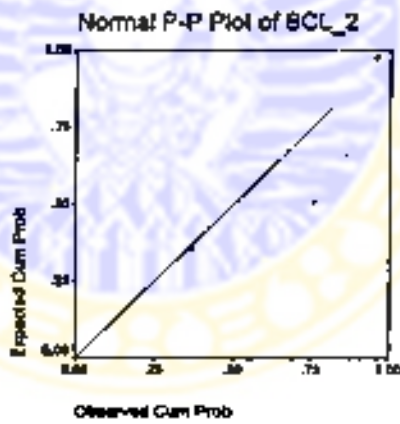
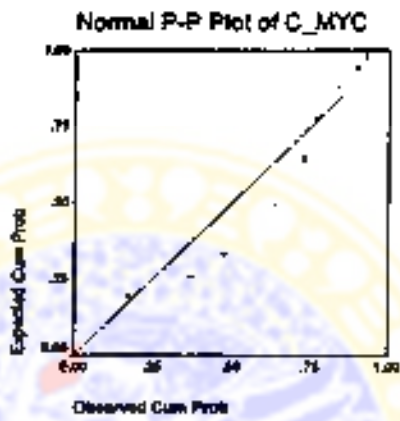
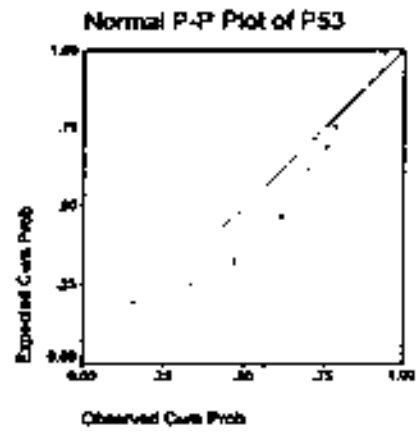


PROSEDUR KERJA IMUNOHISTOKIMA

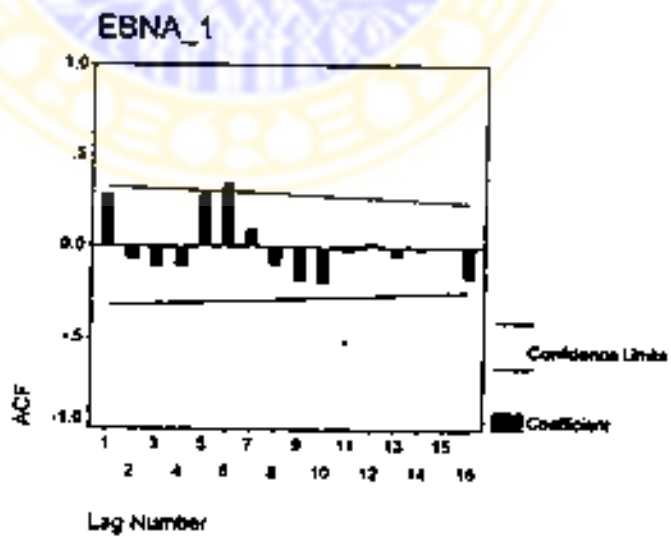
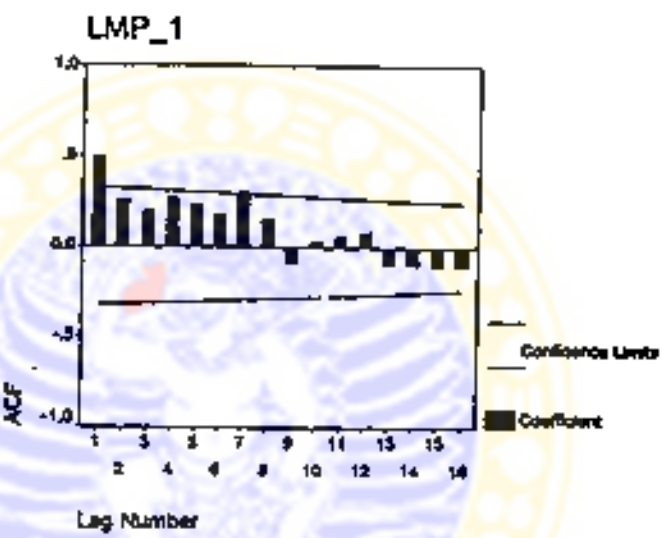
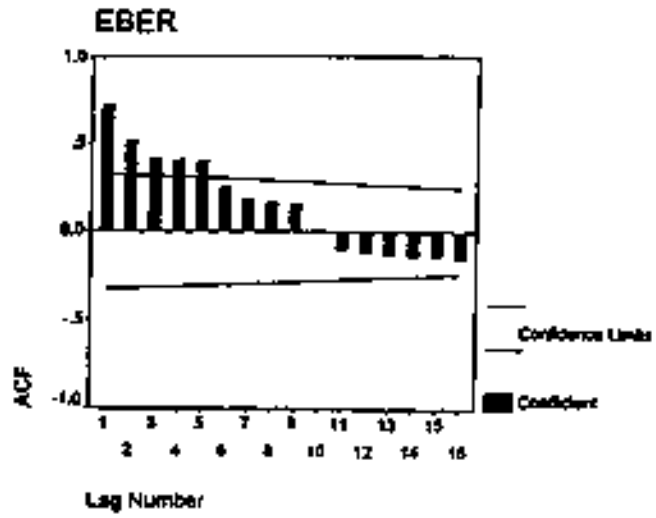
<ul style="list-style-type: none"> - Jaringan segar di blok dengan cryomatrik kemudian potong beku - Fiksasi dengan buffer formalin - Rehidrasi dengan mencelupkan ke dalam: <ul style="list-style-type: none"> etanol aseton - Cuci dengan PBS <p style="text-align: center;">Catatan: untuk <i>slide block</i> paraffin dilakukan deparafinisasi sepanjang malam</p>	<p>Dalam, 20 menit</p> <p>Suhu 20°C, 5 menit</p> <p>Suhu 20°C, 5 menit</p> <p><i>Over night</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Blocking agent</i>: tetesi slide dengan normal serum yang telah dilarutkan dengan PBS - Primer Antibodi: tetesi slide dengan primer Antibodi monoklonal yang sesuai dan telah dilarutkan dalam PBSA - Pencucian dengan PBS 3x 	<p>10 menit</p> <p><i>over night</i> pada suhu 4°C</p> <p>setiap kali ganti bahan</p>
<p>Avidin-Biotin complex:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tetesi dengan biotin yang telah dilarutkan dalam buffer - Cuci dengan PBS - Tetesi dengan Avidin - Cuci dengan PBS 	<p>30 menit</p> <p>30 menit</p>
<p>Deteksi</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tetesi dengan bahan DAB yang dibuat dari: 1 cc distilled water <ul style="list-style-type: none"> 20 µl Buffer stock solution 40 µl DAB stock solution 20 µl H₂O₂ - Cuci 	<p>8 menit</p>
<p>Counter stain dan mounting</p> <ul style="list-style-type: none"> - Menggunakan metode Haris 	

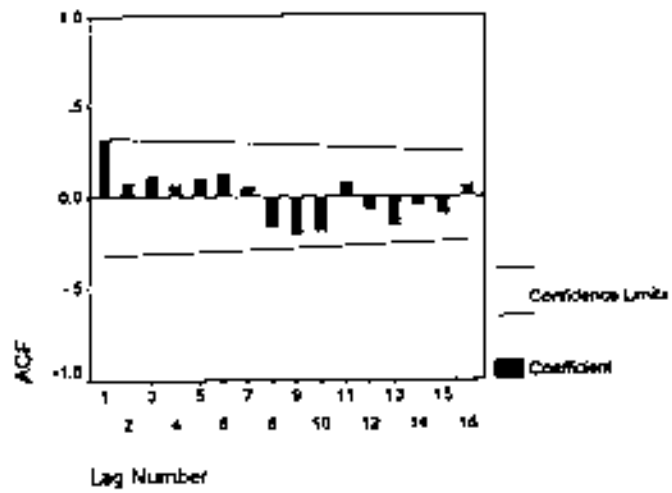




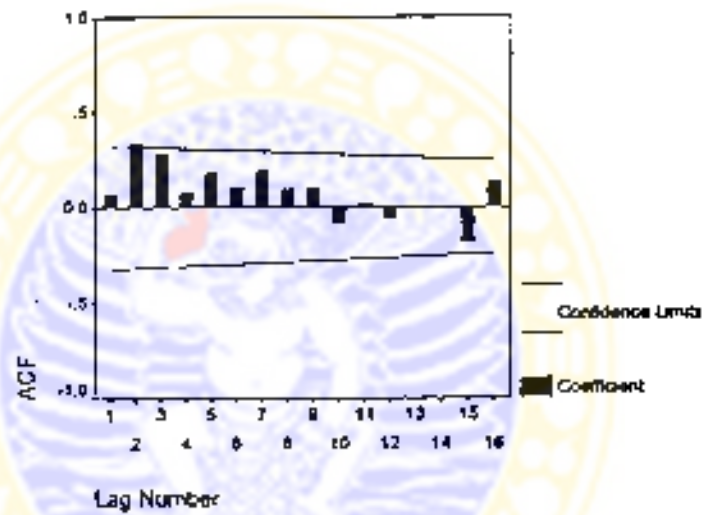


ACF

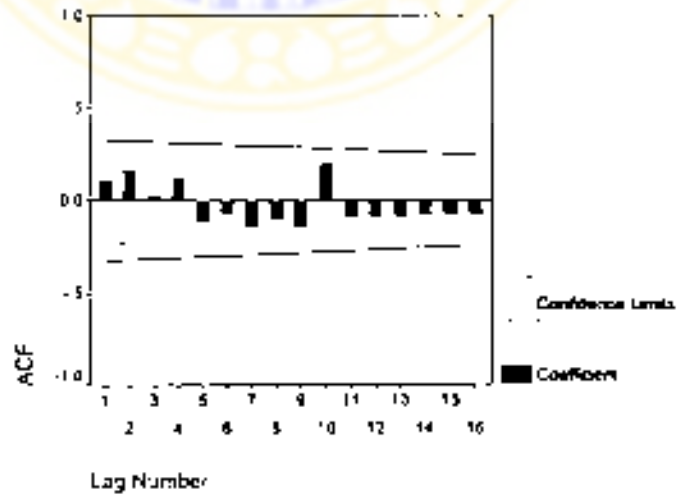




C_MYC



BCL_2



Between-Subjects Factors

	Value Label	N
KELOMPOK	1.00 Terinfeksi	17
	2.00 Tidak terinfeksi	8
	3.00 Control	10

Descriptive Statistics

	KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
EBER	Terinfeksi	27.06	25.92	17
	Tidak terinfeksi	.00	.00	8
	Control	.00	.00	10
	Total	13.29	22.39	35
LMP_1	Terinfeksi	16.47	20.29	17
	Tidak terinfeksi	.00	.00	8
	Control	.00	.00	10
	Total	8.00	16.23	35
EBNA_1	Terinfeksi	14.71	13.75	17
	Tidak terinfeksi	.00	.00	8
	Control	.00	.00	10
	Total	7.14	12.02	35

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.457	8.424 ^a	3.000	30.000	.000
	Wilks' Lambda	.543	8.424 ^a	3.000	30.000	.000
	Hotelling's Trace	.842	8.424 ^a	3.000	30.000	.000
	Roy's Largest Root	.842	8.424 ^a	3.000	30.000	.000
KELOMPOK	Pillai's Trace	.671	5.215	6.000	62.000	.000
	Wilks' Lambda	.329	7.429 ^a	6.000	60.000	.000
	Hotelling's Trace	2.037	9.848	6.000	58.000	.000
	Roy's Largest Root	2.037	21.053 ^b	3.000	31.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level

c. Design: Intercept+KELOMPOK

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	EBER	6271.702 ^a	2	3135.851	9.313	.001
	LMP_1	2371.765 ^b	2	1185.882	5.760	.007
	EBNA_1	1890.756 ^c	2	945.378	10.006	.000
Intercept	EBER	2575.919	1	2575.919	7.947	.008
	LMP_1	955.806	1	955.806	4.642	.039
	EBNA_1	761.963	1	761.963	8.064	.006
KELOMPOK	EBER	6271.702	2	3135.851	9.313	.001
	LMP_1	2371.765	2	1185.882	5.760	.007
	EBNA_1	1890.756	2	945.378	10.006	.000
Error	EBER	10775.441	32	336.733		
	LMP_1	6588.235	32	205.882		
	EBNA_1	3023.529	32	94.485		
Total	EBER	23225.000	35			
	LMP_1	11200.000	35			
	EBNA_1	6700.000	35			
Corrected Total	EBER	17047.143	34			
	LMP_1	8960.000	34			
	EBNA_1	4914.286	34			

- a. R Squared = .368 (Adjusted R Squared = .328)
- b. R Squared = .265 (Adjusted R Squared = .219)
- c. R Squared = .385 (Adjusted R Squared = .346)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

D

Independent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
BER	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	27.06*	7.87	.002	11.03	43.08
		Control	26.56*	7.31	.001	11.66	41.46
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-27.06*	7.87	.002	-43.08	-11.03
		Control	-.50	8.70	.955	-16.23	17.23
	Control	Terinfeksi	-26.56*	7.31	.001	-41.46	-11.66
		Tidak terinfeksi	.50	8.70	.955	-17.23	16.23
MP_1	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	16.47*	6.15	.012	3.94	29.00
		Control	16.47*	5.72	.007	4.82	28.12
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-16.47*	6.15	.012	-29.00	-3.94
		Control	.00	6.81	1.000	-13.86	13.86
	Control	Terinfeksi	-16.47*	5.72	.007	-28.12	-4.82
		Tidak terinfeksi	.00	6.81	1.000	-13.86	13.86
BNA_1	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	14.71*	4.17	.001	6.22	23.19
		Control	14.71*	3.87	.001	6.82	22.60
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-14.71*	4.17	.001	-23.19	-6.22
		Control	.00	4.61	1.000	-9.39	9.39
	Control	Terinfeksi	-14.71*	3.87	.001	-22.60	-6.82
		Tidak terinfeksi	.00	4.61	1.000	-9.39	9.39

based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Dependent Variable	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
EBER	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	27.06*	7.87	.002	11.03	43.08
		Control	26.56*	7.31	.001	11.66	41.46
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-27.06*	7.87	.002	-43.08	-11.03
		Control	-.50	8.70	.955	-18.23	17.23
	Control	Terinfeksi	-26.56*	7.31	.001	-41.46	-11.66
		Tidak terinfeksi	.50	8.70	.955	-17.23	16.23
LMP_1	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	16.47*	6.15	.012	3.94	29.00
		Control	16.47*	5.72	.007	4.62	28.12
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-16.47*	6.15	.012	-29.00	-3.94
		Control	.00	6.81	1.000	-13.86	13.86
	Control	Terinfeksi	-16.47*	5.72	.007	-25.12	-4.82
		Tidak terinfeksi	.00	6.81	1.000	-13.86	13.86
EBNA_1	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	14.71*	4.17	.001	6.22	23.19
		Control	14.71*	3.87	.001	6.62	22.80
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-14.71*	4.17	.001	-23.19	-6.22
		Control	.00	4.61	1.000	-9.39	9.39
	Control	Terinfeksi	-14.71*	3.87	.001	-22.60	-6.82
		Tidak terinfeksi	.00	4.61	1.000	-9.39	9.39
P53	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	12.83	9.66	.194	-6.66	32.52
		Control	33.71*	8.98	.001	15.41	52.00
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-12.83	9.66	.194	-32.52	6.66
		Control	20.88	10.89	.060	-.91	42.88
	Control	Terinfeksi	-33.71*	8.98	.001	-52.00	-15.41
		Tidak terinfeksi	-20.88	10.89	.060	-42.88	.91
C_MYC	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	13.57	9.09	.145	-4.95	32.08
		Control	31.44*	8.46	.001	14.23	48.65
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	-13.57	9.09	.145	-32.08	4.95
		Control	17.87	10.05	.085	-2.61	37.36
	Control	Terinfeksi	-31.44*	8.46	.001	-48.65	-14.23
		Tidak terinfeksi	-17.87	10.05	.085	-35.36	2.61
BCL_2	Terinfeksi	Tidak terinfeksi	-1.32	5.53	.812	-12.69	9.94
		Control	6.16	5.14	.238	-4.30	16.65
	Tidak terinfeksi	Terinfeksi	1.32	5.53	.812	-9.94	12.59
		Control	7.50	6.12	.229	-4.97	19.97
	Control	Terinfeksi	-6.16	5.14	.238	-16.65	4.30
		Tidak terinfeksi	-7.50	6.12	.229	-19.97	4.97

Based on observed means.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

	n	group	eber	lmp_1	ebna_1	p53	c_myc	bcl_2
1	1	1	20	60	20	30	70	0
2	2	1	70	50	10	80	10	0
3	3	1	80	40	20	80	20	0
4	4	1	80	0	0	10	80	0
5	5	1	20	20	0	30	20	0
6	6	1	30	20	20	20	30	0
7	7	1	40	0	0	0	40	0
8	8	1	30	30	0	0	0	0
9	9	1	40	30	30	80	50	0
10	10	1	0	0	0	10	10	0
11	11	1	40	0	0	10	60	30
12	12	1	30	0	0	10	20	0
13	13	1	0	30	0	0	40	0
14	14	1	0	0	30	50	0	0
15	15	1	0	0	30	20	20	0
16	16	1	0	0	30	40	20	0
17	17	1	0	0	0	30	50	10
18	18	1	0	0	0	10	50	0
19	19	1	0	0	0	50	20	10
20	20	1	0	0	30	80	80	5
21	21	1	0	0	30	50	0	70
22	22	1	0	0	0	10	0	10
23	23	1	0	0	0	20	10	10
24	24	1	0	0	0	10	5	10
25	25	1	0	0	0	35	10	10
26	1	2	0	0	0	0	0	0
27	2	2	5	0	0	0	0	0
28	3	2	0	0	0	0	0	0
29	4	2	0	0	0	0	0	0
30	5	2	0	0	0	0	0	0
31	6	2	0	0	0	0	0	0
32	7	2	0	0	0	5	10	0
33	8	2	0	0	0	5	5	0
34	9	2	0	0	0	0	0	0
35	10	2	0	0	0	0	0	0

General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Cluster Number of Case	1	cluster 1	10
	2	cluster 2	3
	3	cluster 3	4
	4	tdk inveksi	8
	5	control	10

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df
Intercept	Pillar's Trace	.936	61.151 ^a	6.000
	Wilks' Lambda	.064	61.151 ^a	6.000
	Hotelling's Trace	14.676	61.151 ^a	6.000
	Roy's Largest Root	14.676	61.151 ^a	6.000
KELOMPOK	Pillar's Trace	2.475	7.571	24.000
	Wilks' Lambda	.006	12.245	24.000
	Hotelling's Trace	16.998	16.644	24.000
	Roy's Largest Root	11.958	55.803 ^b	6.000

Multivariate Tests^a

Effect		Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	25.000	.000
	Wilks' Lambda	25.000	.000
	Hotelling's Trace	25.000	.000
	Roy's Largest Root	25.000	.000
KELOMPOK	Pillai's Trace	112.000	.000
	Wilks' Lambda	88.425	.000
	Hotelling's Trace	94.000	.000
	Roy's Largest Root	28.000	.000

- a. Exact statistic.
b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.
c. Design: Intercept+KELOMPOK



Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	EBER	13147.976 ^a	4	3286.994
	LMP_1	5120.000 ^b	4	1280.000
	EBNA_1	3504.286 ^c	4	876.071
	P53	15887.411 ^d	4	3971.853
	C_MYC	9693.244 ^e	4	2423.311
	BCL_2	1019.843 ^f	4	254.911
Intercept	EBER	9083.333	1	9083.333
	LMP_1	3452.477	1	3452.477
	EBNA_1	3576.881	1	3576.881
	P53	28847.907	1	28847.907
	C_MYC	11351.240	1	11351.240
	BCL_2	894.220	1	894.220
KELOMPOK	EBER	13147.976	4	3286.994
	LMP_1	5120.000	4	1280.000
	EBNA_1	3504.286	4	876.071
	P53	15887.411	4	3971.853
	C_MYC	9693.244	4	2423.311
	BCL_2	1019.843	4	254.911
Error	EBER	3899.167	30	129.972
	LMP_1	3840.000	30	128.000
	EBNA_1	1410.000	30	47.000
	P53	7526.875	30	250.896
	C_MYC	10931.042	30	364.368
	BCL_2	4827.500	30	154.250
Total	EBER	23225.000	35	
	LMP_1	11200.000	35	
	EBNA_1	6700.000	35	
	P53	40575.000	35	
	C_MYC	35850.000	35	
	BCL_2	6425.000	35	
Corrected Total	EBER	17047.143	34	
	LMP_1	8960.000	34	
	EBNA_1	4914.286	34	
	P53	23414.286	34	
	C_MYC	20624.286	34	
	BCL_2	5847.143	34	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	EBER	25.290	.000
	LMP_1	10.000	.000
	EBNA_1	18.640	.000
	P53	15.831	.000
	C_MYC	6.651	.001
	BCL_2	1.653	.187
Intercept	EBER	69.887	.000
	LMP_1	26.972	.000
	EBNA_1	76.104	.000
	P53	114.980	.000
	C_MYC	31.153	.000
	BCL_2	5.787	.022
KELOMPOK	EBER	25.290	.000
	LMP_1	10.000	.000
	EBNA_1	18.640	.000
	P53	15.831	.000
	C_MYC	6.651	.001
	BCL_2	1.653	.187
Error	EBER		
	LMP_1		
	EBNA_1		
	P53		
	C_MYC		
	BCL_2		
Total	EBER		
	LMP_1		
	EBNA_1		
	P53		
	C_MYC		
	BCL_2		
Corrected Total	EBER		
	LMP_1		
	EBNA_1		
	P53		
	C_MYC		
	BCL_2		

a. R Squared = .771 (Adjusted R Squared = .741)

b. R Squared = .571 (Adjusted R Squared = .514)

c. R Squared = .713 (Adjusted R Squared = .675)

d. R Squared = .679 (Adjusted R Squared = .636)

e. R Squared = .470 (Adjusted R Squared = .399)

f. R Squared = .181 (Adjusted R Squared = .071)

Post Hoc Tests

Cluster Number of Case

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
EBER	claster 1	claster 2	-35.33*	7.50	.000
		claster 3	27.00*	6.74	.000
		tdk ineksi	27.00*	5.41	.000
		control	26.50*	5.10	.000
	claster 2	claster 1	36.33*	7.50	.000
		claster 3	63.33*	8.71	.000
		tdk ineksi	63.33*	7.72	.000
		control	62.83*	7.50	.000
	claster 3	claster 1	-27.00*	6.74	.000
		claster 2	-63.33*	6.71	.000
		tdk ineksi	.00	6.98	1.000
		control	-.50	6.74	.941
	tdk ineksi	claster 1	-27.00*	5.41	.000
		claster 2	-63.33*	7.72	.000
		claster 3	.00	6.98	1.000
		control	-.50	5.41	.927
	control	claster 1	-26.50*	5.10	.000
		claster 2	-62.83*	7.50	.000
		claster 3	.50	6.74	.941
		tdk ineksi	.50	5.41	.927
LMP_1	claster 1	claster 2	-24.00*	7.45	.003
		claster 3	16.00*	6.69	.023
		tdk ineksi	16.00*	5.37	.006
		control	16.00*	5.06	.004
	claster 2	claster 1	24.00*	7.45	.003
		claster 3	40.00*	8.64	.000
		tdk ineksi	40.00*	7.66	.000
		control	40.00*	7.45	.000
	claster 3	claster 1	-16.00*	6.69	.023
		claster 2	-40.00*	8.64	.000
		tdk ineksi	.00	6.93	1.000
		control	.00	6.69	1.000
	tdk ineksi	claster 1	-16.00*	5.37	.006
		claster 2	-40.00*	7.66	.000
		claster 3	.00	6.93	1.000
		control	.00	5.37	1.000
	control	claster 1	-16.00*	5.06	.004
		claster 2	-40.00*	7.45	.000
		claster 3	.00	6.69	1.000
		tdk ineksi	.00	5.37	1.000

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
EBNA_1	claster 1	claster 2	-13.00*	4.51	.007
		claster 3	-23.00*	4.06	.000
		tdk inveksi	7.00*	3.25	.040
		control	7.00*	3.07	.030
	claster 2	claster 1	13.00*	4.51	.007
		claster 3	-10.00	5.24	.066
		tdk inveksi	20.00*	4.64	.000
		control	20.00*	4.51	.000
	claster 3	claster 1	23.00*	4.06	.000
		claster 2	10.00	5.24	.066
		tdk inveksi	30.00*	4.20	.000
		control	30.00*	4.06	.000
	tdk inveksi	claster 1	-7.00*	3.25	.040
		claster 2	-20.00*	4.64	.000
		claster 3	-30.00*	4.20	.000
		control	.00	3.25	1.000
control	claster 1	-7.00*	3.07	.030	
	claster 2	-20.00*	4.51	.000	
	claster 3	-30.00*	4.06	.000	
	tdk inveksi	.00	3.25	1.000	
P53	claster 1	claster 2	-51.00*	10.43	.000
		claster 3	-21.00*	9.37	.033
		tdk inveksi	-2.88	7.51	.705
		control	18.00*	7.06	.016
	claster 2	claster 1	61.00*	10.43	.000
		claster 3	40.00*	12.10	.002
		tdk inveksi	58.13*	10.72	.000
		control	79.00*	10.43	.000
	claster 3	claster 1	21.00*	9.37	.033
		claster 2	-40.00*	12.10	.002
		tdk inveksi	18.13	9.70	.071
		control	39.00*	9.37	.000
	tdk inveksi	claster 1	2.88	7.51	.705
		claster 2	-58.13*	10.72	.000
		claster 3	-18.13	9.70	.071
		control	20.88*	7.51	.009
control	claster 1	-18.00*	7.06	.016	
	claster 2	-79.00*	10.43	.000	
	claster 3	-39.00*	9.37	.000	
	tdk inveksi	-20.88*	7.51	.008	

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
C_MYC	cluster 1	cluster 2	17.33	12.57	.178
		cluster 3	34.00*	11.29	.005
		tdk inveksi	24.63*	9.05	.011
		control	42.50*	8.54	.000
	cluster 2	cluster 1	-17.33	12.57	.178
		cluster 3	16.67	14.58	.262
		tdk inveksi	7.29	12.92	.577
		control	25.17	12.57	.054
	cluster 3	cluster 1	-34.00*	11.29	.005
		cluster 2	-16.67	14.58	.262
		tdk inveksi	-9.37	11.69	.429
		control	8.50	11.29	.458
	tdk inveksi	cluster 1	-24.63*	9.05	.011
		cluster 2	-7.29	12.92	.577
		cluster 3	9.37	11.69	.429
		control	17.87	9.05	.058
control	cluster 1	-42.50*	8.54	.000	
	cluster 2	-25.17	12.57	.054	
	cluster 3	-8.50	11.29	.458	
	tdk inveksi	-17.87	9.05	.058	
BCL_2	cluster 1	cluster 2	3.50	8.18	.672
		cluster 3	-14.00	7.35	.066
		tdk inveksi	-4.00	5.89	.502
		control	3.50	5.55	.533
	cluster 2	cluster 1	-3.50	8.18	.672
		cluster 3	-17.50	9.49	.075
		tdk inveksi	-7.50	8.41	.379
		control	.00	8.18	1.000
	cluster 3	cluster 1	14.00	7.35	.066
		cluster 2	17.50	9.49	.075
		tdk inveksi	10.00	7.61	.199
		control	17.50*	7.35	.024
	tdk inveksi	cluster 1	4.00	5.89	.502
		cluster 2	7.50	8.41	.379
		cluster 3	-10.00	7.61	.199
		control	7.50	5.89	.213
control	cluster 1	-3.50	5.55	.533	
	cluster 2	.00	8.18	1.000	
	cluster 3	-17.50*	7.35	.024	
	tdk inveksi	-7.50	5.89	.213	

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
EUBER	cluster 1	cluster 2	-51.66	-21.01
		cluster 3	13.23	40.77
		tdk ineksi	15.96	39.04
		control	16.09	36.91
	cluster 2	cluster 1	21.01	51.66
		cluster 3	45.55	81.12
		tdk ineksi	47.57	79.10
		control	47.51	78.16
	cluster 3	cluster 1	-40.77	-13.23
		cluster 2	-81.12	-45.55
		tdk ineksi	-14.26	14.26
		control	-14.27	13.27
	tdk ineksi	cluster 1	-38.04	-15.96
		cluster 2	-79.10	-47.57
		cluster 3	-14.26	14.26
		control	-11.54	10.54
	control	cluster 1	-36.91	-16.09
		cluster 2	-78.16	-47.51
		cluster 3	-13.27	14.27
		tdk ineksi	-10.54	11.54
LMP_1	cluster 1	cluster 2	-39.21	-8.79
		cluster 3	2.33	29.67
		tdk ineksi	5.04	26.96
		control	5.67	26.33
	cluster 2	cluster 1	8.79	39.21
		cluster 3	22.35	57.65
		tdk ineksi	24.36	55.64
		control	24.79	55.21
	cluster 3	cluster 1	-29.67	-2.33
		cluster 2	-57.65	-22.35
		tdk ineksi	-14.15	14.15
		control	-13.67	13.67
	tdk ineksi	cluster 1	-26.96	-5.04
		cluster 2	-55.64	-24.36
		cluster 3	-14.15	14.15
		control	-10.96	10.96
	control	cluster 1	-26.33	-5.67
		cluster 2	-55.21	-24.79
		cluster 3	-13.67	13.67
		tdk ineksi	-10.96	10.96

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
EBNA_1	cluster 1	cluster 2	-22.22	-3.76
		cluster 3	-31.28	-14.72
		tdk infeksi	.36	13.64
		control	.74	13.26
	cluster 2	cluster 1	3.78	22.22
		cluster 3	-20.69	.69
		tdk infeksi	10.52	29.48
		control	10.76	29.22
	cluster 3	cluster 1	14.72	31.28
		cluster 2	-.69	20.69
		tdk infeksi	21.43	38.57
		control	21.72	38.28
tdk infeksi	cluster 1	-13.64	-.36	
	cluster 2	-29.48	-10.52	
	cluster 3	-38.57	-21.43	
	control	-6.64	6.64	
control	cluster 1	-13.26	-.74	
	cluster 2	-29.22	-10.76	
	cluster 3	-38.28	-21.72	
	tdk infeksi	-6.64	6.64	
P53	cluster 1	cluster 2	-82.29	-39.71
		cluster 3	-40.14	-1.86
		tdk infeksi	-18.22	12.47
		control	3.53	32.47
	cluster 2	cluster 1	39.71	82.29
		cluster 3	15.29	64.71
		tdk infeksi	36.22	80.03
		control	57.71	100.29
	cluster 3	cluster 1	1.86	40.14
		cluster 2	-64.71	-15.29
		tdk infeksi	-1.68	37.93
		control	19.86	58.14
tdk infeksi	cluster 1	-12.47	18.22	
	cluster 2	-80.03	-36.22	
	cluster 3	-37.93	1.68	
	control	5.53	36.22	
control	cluster 1	-32.47	-3.53	
	cluster 2	-100.29	-57.71	
	cluster 3	-58.14	-19.86	
	tdk infeksi	-36.22	-5.53	

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
C_MYC	cluster 1	cluster 2	-8.33	43.00
		cluster 3	10.94	57.06
		tdk infeksi	6.13	43.12
		control	25.07	58.83
	cluster 2	cluster 1	-43.00	8.33
		cluster 3	-13.11	46.44
		tdk infeksi	-19.10	33.68
		control	-.50	50.83
	cluster 3	cluster 1	-57.06	-10.94
		cluster 2	-46.44	13.11
		tdk infeksi	-33.25	14.50
		control	-14.56	31.56
	tdk infeksi	cluster 1	-43.12	-8.13
		cluster 2	-33.68	19.10
		cluster 3	-14.50	33.25
		control	-.62	36.37
control	cluster 1	-59.93	-25.07	
	cluster 2	-50.83	.50	
	cluster 3	-31.56	14.56	
	tdk infeksi	-36.37	.62	
BCL_2	cluster 1	cluster 2	-13.20	20.20
		cluster 3	-29.01	1.01
		tdk infeksi	-16.03	8.03
		control	-7.84	14.84
	cluster 2	cluster 1	-20.20	13.20
		cluster 3	-36.87	1.87
		tdk infeksi	-24.67	9.67
		control	-16.70	16.70
	cluster 3	cluster 1	-1.01	29.01
		cluster 2	-1.87	36.87
		tdk infeksi	-5.53	25.53
		control	2.49	32.51
	tdk infeksi	cluster 1	-8.03	16.03
		cluster 2	-9.67	24.67
		cluster 3	-25.53	5.53
		control	-4.53	19.53
control	cluster 1	-14.84	7.84	
	cluster 2	-16.70	16.70	
	cluster 3	-32.51	-2.49	
	tdk infeksi	-19.53	4.53	

Based on observed means

* The mean difference is significant at the .05 level.

Discriminant

Analysis Case Processing Summary

Unweighted Cases		N	Percent
Valid		35	100.0
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0	0
	At least one missing discriminating variable	0	0
	Both missing or out-of-range group codes and at least one missing discriminating variable	0	0
	Total	0	.0
Total		35	100.0



Group Statistics

Cluster Number of Case		Mean	Std. Deviation
claster 1	EBER	27.00	18.29
	LMP_1	18.00	20.11
	EBNA_1	7.00	11.60
	P53	19.00	24.24
	C_MYC	44.00	27.57
	BCL_2	3.50	9.44
claster 2	EBER	63.33	20.62
	LMP_1	40.00	10.00
	EBNA_1	20.00	10.00
	P53	60.00	.00
	C_MYC	26.67	20.82
	BCL_2	.00	.00
claster 3	EBER	.00	.00
	LMP_1	.00	.00
	EBNA_1	30.00	.00
	P53	40.00	14.14
	C_MYC	10.00	11.55
	BCL_2	17.50	35.00
tdk invaksi	EBER	.00	.00
	LMP_1	.00	.00
	EBNA_1	.00	.00
	P53	21.88	15.10
	C_MYC	19.38	19.72
	BCL_2	7.50	4.63
control	EBER	.00	.00
	LMP_1	.00	.00
	EBNA_1	.00	.00
	P53	.00	.00
	C_MYC	.00	.00
	BCL_2	.00	.00
Total	EBER	13.29	22.39
	LMP_1	8.00	16.23
	EBNA_1	7.14	12.02
	P53	22.14	26.24
	C_MYC	20.66	24.63
	BCL_2	4.71	12.89

Group Statistics

Cluster Number of Case		Valid N (Listwise)	
		Unweighted	Weighted
cluster 1	EBER	10	10.000
	LMP_1	10	10.000
	EBNA_1	10	10.000
	P53	10	10.000
	C_MYC	10	10.000
	BCL_2	10	10.000
cluster 2	EBER	3	3.000
	LMP_1	3	3.000
	EBNA_1	3	3.000
	P53	3	3.000
	C_MYC	3	3.000
	BCL_2	3	3.000
cluster 3	EBER	4	4.000
	LMP_1	4	4.000
	EBNA_1	4	4.000
	P53	4	4.000
	C_MYC	4	4.000
	BCL_2	4	4.000
tdik invoksl	EBER	8	8.000
	LMP_1	8	8.000
	EBNA_1	8	8.000
	P53	8	8.000
	C_MYC	8	8.000
	BCL_2	8	8.000
control	EBER	10	10.000
	LMP_1	10	10.000
	EBNA_1	10	10.000
	P53	10	10.000
	C_MYC	10	10.000
	BCL_2	10	10.000
Total	EBER	35	35.000
	LMP_1	35	35.000
	EBNA_1	35	35.000
	P53	35	35.000
	C_MYC	35	35.000
	BCL_2	35	35.000

Tests of Equality of Group Means

	Wilks' Lambda	F	df1	df2	Sig.
EBER	.229	25.290	4	30	.000
LMP_1	.429	10.000	4	30	.000
EBNA_1	.287	16.640	4	30	.000
P53	.321	15.631	4	30	.000
C_MYC	.530	6.651	4	30	.001
BCL_2	.619	1.653	4	30	.187

Pooled Within-Groups Matrices^a

		EBER	LMP_1	EBNA_1	P53
Covariance	EBER	129.972	-30.667	-39.667	-67.833
	LMP_1	-30.667	128.000	9.333	-6.000
	EBNA_1	-39.667	9.333	47.000	69.000
	P53	-67.833	-8.000	69.000	250.896
	C_MYC	-18.472	-34.667	57.333	86.979
	BCL_2	8.500	-18.667	-3.167	32.417
Correlation	EBER	1.000	-.238	-.508	-.376
	LMP_1	-.238	1.000	.120	-.045
	EBNA_1	-.508	.120	1.000	.635
	P53	-.376	-.045	.635	1.000
	C_MYC	-.085	-.161	.438	.321
	BCL_2	.080	-.133	-.037	.165

Pooled Within-Groups Matrices^a

		C_MYC	BCL_2
Covariance	EBER	-18.472	8.500
	LMP_1	-34.667	-18.667
	EBNA_1	57.333	-3.167
	P53	96.979	32.417
	C_MYC	354.358	-8.417
	BCL_2	-8.417	154.250
Correlation	EBER	-.085	.060
	LMP_1	-.161	-.133
	EBNA_1	.438	-.037
	P53	.321	.165
	C_MYC	1.000	-.036
	BCL_2	-.036	1.000

a. The covariance matrix has 30 degrees of freedom

Covariance Matrices^a

Cluster Number of Case		EBER	LMP_1	EBNA_1	P53
Total	EBER	501.387	214.118	34.664	235.399
	LMP_1	214.118	263.529	52.941	182.353
	EBNA_1	34.664	52.941	144.538	219.538
	P53	235.399	182.353	219.538	688.655
	C_MYC	197.101	98.824	70.168	191.492
	BCL_2	-29.181	-38.824	31.513	61.660

Covariance Matrices^a

Cluster Number of Case		C_MYC	BCL_2
Total	EBER	197.101	-29.181
	LMP_1	98.824	-38.824
	EBNA_1	70.168	31.513
	P53	191.492	61.660
	C_MYC	606.587	-8.571
	BCL_2	-8.571	166.092

a. The total covariance matrix has 34 degrees of freedom.

Analysis 1**Box's Test of Equality of Covariance Matrices****Log Determinants**

Cluster Number of Case	Rank	Log Determinant
cluster 1	5	27.323
cluster 2	a	b
cluster 3	c	b
tdk inveksi	2	d
control	3	d
Pooled within-groups	5	23.789

The ranks and natural logarithms of determinants printed are those of the group covariance matrices.

- a. Rank < 3
- b. Too few cases to be non-singular
- c. Rank < 4
- d. Singular

Test Results^a

Tests null hypothesis of equal population covariance matrices.

- a. No test can be performed with fewer than two nonsingular group covariance matrices.

Stepwise Statistics

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Entered	Wilks' Lambda			
		Statistic	df1	df2	df3
1	FRER	.229	1	4	30.000
2	EBNA_1	.050	2	4	30.000
3	P53	.023	3	4	30.000
4	C_MYC	.011	4	4	30.000
5	LMP_1	.007	5	4	30.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

Variables Entered/Removed^{a,b,c,d}

Step	Wilks' Lambda			
	Exact F			
	Statistic	df1	df2	Sig.
1	25.290	4	30.000	.000
2	25.322	8	58.000	.000
3				
4				
5				

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered.

Variables Entered/Removed^{a, b, c, d}

Step	Wilks' Lambda			
	Approximate F			
	Statistic	df1	df2	Sig.
1				
2				
3	19.761	12	74.373	.000
4	17.417	16	83.124	.000
5	15.139	20	87.182	.000

At each step, the variable that minimizes the overall Wilks' Lambda is entered

- Maximum number of steps is 12.
- Maximum significance of F to enter is .05.
- Minimum significance of F to remove is .10.
- F level, tolerance, or VIF insufficient for further computation.

Variables in the Analysis

Step		Tolerance	Sig. of F to Remove	Wilks' Lambda
1	EBER	1.000	.000	
2	EBER	.742	.000	.267
	EBNA_1	.742	.000	.229
3	EBER	.738	.000	.107
	EBNA_1	.512	.000	.075
	P53	.592	.000	.050
4	EBER	.713	.000	.050
	EBNA_1	.445	.000	.042
	P53	.589	.000	.025
	C_MYC	.778	.001	.023
5	EBER	.688	.000	.024
	EBNA_1	.432	.000	.027
	P53	.573	.000	.015
	C_MYC	.747	.000	.015
	LMP_1	.877	.012	.011

Variables Not in the Analysis

Step		Tolerance	Min. Tolerance	Sig. of F to Enter	Wilks' Lambda
0	EBER	1.000	1.000	.000	.229
	LMP_1	1.000	1.000	.000	.429
	EBNA_1	1.000	1.000	.000	.287
	P53	1.000	1.000	.000	.321
	C_MYC	1.000	1.000	.001	.530
	BCL_2	1.000	1.000	.187	.819
1	LMP_1	.943	.943	.006	.142
	EBNA_1	.742	.742	.000	.050
	P53	.859	.859	.000	.075
	C_MYC	.993	.993	.004	.138
	BCL_2	.996	.996	.217	.188
2	LMP_1	.943	.711	.017	.033
	P53	.592	.512	.000	.023
	C_MYC	.783	.585	.000	.025
	BCL_2	.996	.741	.386	.043
3	LMP_1	.913	.507	.016	.015
	C_MYC	.778	.445	.001	.011
	BCL_2	.935	.501	.256	.018
4	LMP_1	.877	.432	.012	.007
	BCL_2	.932	.438	.272	.009
5	BCL_2	.924	.428	.461	.006

Wilks' Lambda

Step	Number of Variables	Lambda	df1	df2	df3
1	1	.229	1	4	30
2	2	.050	2	4	30
3	3	.023	3	4	30
4	4	.011	4	4	30
5	5	.007	5	4	30

Wilks' Lambda

Step	Exact F			
	Statistic	df1	df2	Sig.
1	25.290	4	30.000	3.084E-09
2	25.322	8	58.000	2.865E-16
3				
4				
5				

Wilks' Lambda

Step	Approximate F			
	Statistic	df1	df2	Sig.
1				
2				
3	13.761	12	74.373	1.712E-18
4	17.417	16	83.124	3.855E-20
5	15.139	20	87.182	.000

Summary of Canonical Discriminant Functions**Eigenvalues**

Function	Eigenvalue	% of Variance	Cumulative %	Canonical Correlation
1	11.889 ^a	71.5	71.5	.960
2	3.519 ^a	21.2	92.7	.882
3	.956 ^b	5.7	98.4	.699
4	.262 ^c	1.6	100.0	.458

a. First 4 canonical discriminant functions were used in the analysis.

Wilks' Lambda

Test of Function(s)	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig.
1 through 4	.007	144.084	20	.000
2 through 4	.350	69.949	17	.000
3 through 4	.405	26.207	6	.000
4	.792	6.755	2	.034

Standardized Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function			
	1	2	3	4
EBER	1.040	-.074	.175	-.327
LMP_1	.534	.444	.097	-.225
EBNA_1	.424	-1.323	.611	-.093
P53	.521	.419	-1.042	.461
C_MYC	-.030	.743	.622	.631

Structure Matrix

	Function			
	1	2	3	4
EBER	.505*	.272	.180	-.453
LMP_1	.319*	.164	.076	-.260
EBNA_1	.279	-.641*	.144	.615
BCL_2 ^a	.063	.028	-.219*	.067
C_MYC	.149	.233	.525	.802*
P53	.366	-.176	-.525	.737*

Pooled within-groups correlations between discriminating variables and standardized canonical discriminant functions

Variables ordered by absolute size of correlation within function.

*. Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

^a. This variable not used in the analysis.

Canonical Discriminant Function Coefficients

	Function			
	1	2	3	4
EBER	.091	-.006	.015	-.029
LMP_1	.047	.039	.009	-.020
EBNA_1	.062	-.193	.088	-.014
P53	.033	.026	-.068	.029
C_MYC	-.002	.039	.033	.033
(Constant)	-2.727	-.247	-.131	-.896

Unstandardized coefficients

Functions at Group Centroids

Cluster Number of Case	Function			
	1	2	3	4
cluster 1	1.480	1.070	1.227	.123
cluster 2	6.766	.204	-1.430	-.372
cluster 3	.429	-4.590	.235	.391
tdk inveksi	-2.038	1.087	-.939	.580
control	-2.651	-.165	-.141	-.632

Unstandardized canonical discriminant functions evaluated at group means

Classification Statistics

Classification Processing Summary

Processed		35
Excluded	Missing or out-of-range group codes	0
	At least one missing discriminating variable	0
Used in Output		35

Prior Probabilities for Groups

Cluster Number of Case	Prior	Cases Used in Analysis	
		Unweighted	Weighted
cluster 1	.200	10	10.000
cluster 2	.200	3	3.000
cluster 3	.200	4	4.000
tdk inveksi	.200	8	8.000
control	.200	10	10.000
Total	1.000	35	35.000

Classification Function Coefficients

	Cluster Number of Case				
	cluster 1	cluster 2	cluster 3	tdk inveksi	control
EBER	.373	1.017	.291	6.111E-03	5.328E-03
LMP_1	.244	.541	-4.127E-02	5.097E-02	3.974E-03
EBNA_1	.118	.504	1.052	-.304	-1.277E-02
P53	.108	.485	-3.499E-03	.148	7.187E-03
C_MYC	.116	-3.212E-02	-.126	6.670E-02	4.852E-03
(Constant)	-12.586	-68.655	-16.682	-3.878	-1.618

Fisher's linear discriminant functions

Classification Results^{bc}

		Predicted Group		
		cluster 1	cluster 2	
Original	Count	cluster 1	9	0
		cluster 2	0	3
		cluster 3	0	0
		tdk infeksi	0	0
		control	0	0
	%	cluster 1	90.0	.0
		cluster 2	.0	100.0
		cluster 3	.0	.0
		tdk infeksi	.0	.0
		control	.0	.0
Cross-validated ^a	Count	cluster 1	6	1
		cluster 2	0	3
		cluster 3	0	0
		tdk infeksi	0	0
		control	0	0
	%	cluster 1	60.0	10.0
		cluster 2	.0	100.0
		cluster 3	.0	.0
		tdk infeksi	.0	.0
		control	.0	.0

Classification Results^{b,c}

			Predicted Group	
			claster 3	tdk infeksi
Original	Count	claster 1	0	1
		claster 2	0	0
		claster 3	4	0
		tdk infeksi	0	5
		control	0	0
	%	claster 1	.0	10.0
		claster 2	0	.0
		claster 3	100.0	0
		tdk infeksi	0	62.5
		control	.0	.0
Cross-validated ^a	Count	claster 1	2	1
		claster 2	0	0
		claster 3	4	0
		tdk infeksi	0	5
		control	0	0
	%	claster 1	20.0	10.0
		claster 2	.0	.0
		claster 3	100.0	.0
		tdk infeksi	0	62.5
		control	.0	.0

Classification Results^{a,c}

		Cluster Number of Case	Predicted	Total
			control	
Original	Count	cluster 1	0	10
		cluster 2	0	3
		cluster 3	0	4
		tdk infeksi	3	8
		control	10	10
	%	cluster 1	.0	100.0
		cluster 2	.0	100.0
		cluster 3	.0	100.0
		tdk infeksi	37.5	100.0
		control	100.0	100.0
Cross-validated ^a	Count	cluster 1	0	10
		cluster 2	0	3
		cluster 3	0	4
		tdk infeksi	3	8
		control	10	10
	%	cluster 1	.0	100.0
		cluster 2	.0	100.0
		cluster 3	.0	100.0
		tdk infeksi	37.5	100.0
		control	100.0	100.0

- a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.
- b. 88.6% of original grouped cases correctly classified.
- c. 80.0% of cross-validated grouped cases correctly classified.

General Linear Model**Between-Subjects Factors**

	Value Label	N
Cluster Number of Case	1 cluster 1	10
	2 cluster 2	3
	3 cluster 3	4
	4 tdk infeksi	8
	5 control	10

Descriptive Statistics

	Cluster Number of Case	Mean	Std. Deviation	N
PIEBER	cluster 1	10.0710	8.8214	10
	cluster 2	64.4100	21.1705	3
	cluster 3	.0000	.0000	4
	tdk infeksi	.0000	.0000	8
	control	.0000	.0000	10
	Total	8.3990	19.0250	35
P1LMP	cluster 1	3.8040	4.9070	10
	cluster 2	21.6400	5.4100	3
	cluster 3	.0000	.0000	4
	tdk infeksi	.0000	.0000	8
	control	.0000	.0000	10
	Total	2.9703	6.6845	35
P1EBNA	cluster 1	.8120	1.3450	10
	cluster 2	10.0800	5.0400	3
	cluster 3	31.5600	.0000	4
	tdk infeksi	.0000	.0000	8
	control	.0000	.0000	10
	Total	4.7028	10.2735	35
PIP53	cluster 1	2.0520	2.6184	10
	cluster 2	38.8000	.0000	3
	cluster 3	-.1400	4.950E-02	4
	tdk infeksi	3.2375	2.2354	8
	control	.0000	.0000	10
	Total	4.6381	10.8277	35
P1C_MYC	cluster 1	5.1040	3.1979	10
	cluster 2	-.8580	.6682	3
	cluster 3	-1.2600	1.4548	4
	tdk infeksi	1.2923	1.3153	8
	control	.0000	.0000	10
	Total	1.5384	3.0243	35

Multivariate Tests^a

Effect		Value	F	Hypothesis df
Intercept	Pillai's Trace	.992	682.272 ^a	5.000
	Wilks' Lambda	.008	682.272 ^a	5.000
	Hotelling's Trace	127.380	682.272 ^a	5.000
	Roy's Largest Root	127.380	682.272 ^a	5.000
KELOMPOK	Pillai's Trace	2.767	13.013	20.000
	Wilks' Lambda	.000	93.014	20.000
	Hotelling's Trace	201.017	246.246	20.000
	Roy's Largest Root	137.459	797.263 ^b	5.000

Multivariate Tests^a

Effect		Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	26.000	.000
	Wilks' Lambda	26.000	.000
	Hotelling's Trace	26.000	.000
	Roy's Largest Root	26.000	.000
KELOMPOK	Pillai's Trace	116.000	.000
	Wilks' Lambda	87.182	.000
	Hotelling's Trace	98.000	.000
	Roy's Largest Root	29.000	.000

a. Exact statistic.

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept+KELOMPOK

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square
Corrected Model	P1EBER	10991.155 ^a	4	2747.789
	P1LMP	1248.490 ^b	4	312.123
	P1EBNA	3521.457 ^c	4	880.364
	P1P53	3889.453 ^d	4	972.363
	P1C_MYC	199.586 ^e	4	49.897
Intercept	P1EBER	6107.688	1	6107.688
	P1LMP	718.344	1	718.344
	P1EBNA	1984.043	1	1984.043
	P1P53	2127.182	1	2127.182
	P1C_MYC	20.239	1	20.239
KELOMPOK	P1EBER	10991.155	4	2747.789
	P1LMP	1248.490	4	312.123
	P1EBNA	3521.457	4	880.364
	P1P53	3889.453	4	972.363
	P1C_MYC	199.586	4	49.897
Error	P1EBER	1315.163	30	43.838
	P1LMP	275.247	30	9.175
	P1EBNA	67.065	30	2.236
	P1P53	96.690	30	3.223
	P1C_MYC	111.394	30	3.713
Total	P1EBER	14775.358	35	
	P1LMP	1832.528	35	
	P1EBNA	4362.632	35	
	P1P53	4739.047	35	
	P1C_MYC	393.612	35	
Corrected Total	P1EBER	12306.318	34	
	P1LMP	1523.737	34	
	P1EBNA	3588.542	34	
	P1P53	3986.143	34	
	P1C_MYC	310.980	34	

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	F	Sig.
Corrected Model	P1EBER	62.679	.000
	P1LMP	34.019	.000
	P1EBNA	383.694	.000
	P1P53	301.695	.000
	P1C_MYC	13.438	.000
Intercept	P1EBER	139.322	.000
	P1LMP	78.294	.000
	P1EBNA	867.252	.000
	P1P53	660.001	.000
	P1C_MYC	5.451	.026
KELOMPOK	P1EBER	62.679	.000
	P1LMP	34.019	.000
	P1EBNA	393.694	.000
	P1P53	301.695	.000
	P1C_MYC	13.438	.000
Error	P1EBER		
	P1LMP		
	P1EBNA		
	P1P53		
	P1C_MYC		
Total	P1EBER		
	P1LMP		
	P1EBNA		
	P1P53		
	P1C_MYC		
Corrected Total	P1EBER		
	P1LMP		
	P1EBNA		
	P1P53		
	P1C_MYC		

a. R Squared = .893 (Adjusted R Squared = .679)

b. R Squared = .819 (Adjusted R Squared = .795)

c. R Squared = .961 (Adjusted R Squared = .979)

d. R Squared = .976 (Adjusted R Squared = .973)

e. R Squared = .642 (Adjusted R Squared = .594)

Estimated Marginal Means

Cluster Number of Case

Dependent Variable	Cluster Number of Case	Mean	Std. Error
P1EBER	cluster 1	10.071	2.094
	cluster 2	64.410	3.823
	cluster 3	-4.337E-19	3.311
	tdk infeksi	.000	2.341
	control	.000	.000
P1LMP	cluster 1	3.904	.958
	cluster 2	21.640	1.749
	cluster 3	-1.972E-31	1.515
	tdk infeksi	1.972E-31	1.071
	control	.000	.000
P1EBNA	cluster 1	.812	.473
	cluster 2	10.080	.863
	cluster 3	31.560	.749
	tdk infeksi	-7.869E-31	.529
	control	.000	.000
P1P53	cluster 1	2.052	.568
	cluster 2	38.800	1.037
	cluster 3	-.140	.898
	tdk infeksi	3.238	.635
	control	.000	.568
P1C_MYC	cluster 1	5.104	.809
	cluster 2	-.856	1.113
	cluster 3	-1.260	.963
	tdk infeksi	1.292	.681
	control	.000	.000

Cluster Number of Case

Dependent Variable	Cluster Number of Case	95% Confidence Interval	
		Lower Bound	Upper Bound
P1EBER	cluster 1	5,795	14,347
	cluster 2	56,603	72,217
	cluster 3	-6,761	6,761
	tdk infeksi	-4,781	4,781
	control	-4,273	4,279
P1LMP	cluster 1	1,949	5,860
	cluster 2	16,068	25,212
	cluster 3	-3,093	3,093
	tdk infeksi	-2,187	2,187
	control	-1,956	1,956
P1EBNA	cluster 1	-,154	1,778
	cluster 2	6,317	11,843
	cluster 3	30,033	33,067
	tdk infeksi	-1,080	1,080
	control	-,966	,966
P1P53	cluster 1	,693	3,211
	cluster 2	36,683	40,917
	cluster 3	-1,973	1,693
	tdk infeksi	1,941	4,534
	control	-1,152	1,167
P1C_MYC	cluster 1	3,860	6,348
	cluster 2	-3,128	1,416
	cluster 3	-3,228	,708
	tdk infeksi	-9,905E-02	2,684
	control	-1,237	1,252

Post Hoc Tests**Cluster Number of Case**

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error
P1EBER	claster 1	claster 2	-54.3390*	4.3585
		claster 3	10.0710*	3.9171
		tdk inveksi	10.0710*	3.1407
		control	10.0683*	2.9610
	claster 2	claster 1	54.3390*	4.3585
		claster 3	64.4100*	5.0569
		tdk inveksi	64.4100*	4.4825
		control	64.4073*	4.3585
	claster 3	claster 1	-10.0710*	3.9171
		claster 2	-64.4100*	5.0569
		tdk inveksi	.0000	4.0546
		control	-2.6640E-03	3.9171
	tdk inveksi	claster 1	-10.0710*	3.1407
		claster 2	-64.4100*	4.4825
		claster 3	.0000	4.0546
		control	-2.6640E-03	3.1407
control	claster 1	-10.0683*	2.9610	
	claster 2	-64.4073*	4.3585	
	claster 3	2.664E-03	3.9171	
	tdk inveksi	2.684E-03	3.1407	
P1LMP	claster 1	claster 2	-17.7360*	1.9939
		claster 3	3.9040*	1.7920
		tdk inveksi	3.9040*	1.4368
		control	3.9040*	1.3546
		claster 2	claster 1	17.7360*
	claster 2	claster 1	17.7360*	1.9939
		claster 3	21.6400*	2.3134
		tdk inveksi	21.6400*	2.0507
		control	21.6400*	1.9939
	claster 3	claster 1	-3.9040*	1.7920
		claster 2	-21.6400*	2.3134
		tdk inveksi	.0000	1.8549
		control	.0000	1.7920
	tdk inveksi	claster 1	-3.9040*	1.4368
		claster 2	-21.6400*	2.0507
		claster 3	.0000	1.8549
control		.0000	1.4368	
control	claster 1	-3.9040*	1.3546	
	claster 2	-21.6400*	1.9939	
	claster 3	.0000	1.7920	
	tdk inveksi	.0000	1.4368	

Based on observed means

LSD

Dependant Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error
P1E3NA	cluster 1	cluster 2	-9.2680*	.9844
		cluster 3	-30.7480*	.8847
		tdk inveksi	.8120	.7093
		control	.8120	.6588
	cluster 2	cluster 1	9.2680*	.9844
		cluster 3	-21.4800*	1.1421
		tdk inveksi	10.0800*	1.0124
		control	10.0800*	.9844
	cluster 3	cluster 1	30.7480*	.8847
		cluster 2	21.4800*	1.1421
		tdk inveksi	31.5600*	.9157
		control	31.5600*	.8847
	tdk inveksi	cluster 1	-.8120	.7093
		cluster 2	-10.0800*	1.0124
		cluster 3	-31.5600*	.9157
		control	.0000	.7093
control	cluster 1	-.8120	.6588	
	cluster 2	-10.0800*	.9844	
	cluster 3	-31.5600*	.8847	
	tdk inveksi	.0000	.7093	
P1P53	cluster 1	cluster 2	-36.7480*	1.1818
		cluster 3	2.1920*	1.0621
		tdk inveksi	-1.1855	.8516
		control	2.0448*	.8029
	cluster 2	cluster 1	36.7480*	1.1818
		cluster 3	38.9400*	1.3712
		tdk inveksi	35.5625*	1.2154
		control	38.7928*	1.1818
	cluster 3	cluster 1	-2.1920*	1.0621
		cluster 2	-38.9400*	1.3712
		tdk inveksi	-3.3775*	1.0994
		control	-.1472	1.0621
	tdk inveksi	cluster 1	1.1855	.8516
		cluster 2	-35.5625*	1.2154
		cluster 3	3.3775*	1.0994
		control	3.2303*	.8516
control	cluster 1	-2.0448*	.8029	
	cluster 2	-38.7928*	1.1818	
	cluster 3	.1472	1.0621	
	tdk inveksi	-3.2303*	.8516	

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Mean Difference (I-J)	Std. Error
PIC_MYC	cluster 1	cluster 2	5.9600*	1.2685
		cluster 3	6.3640*	1.1400
		tdk inveksi	3.8117*	.9140
		control	5.0967*	.8618
	cluster 2	cluster 1	-5.9600*	1.2685
		cluster 3	.4040	1.4717
		tdk inveksi	-2.1483	1.3046
		control	-.8633	1.2685
	cluster 3	cluster 1	-6.3640*	1.1400
		cluster 2	-.4040	1.4717
		tdk inveksi	-2.5523*	1.1800
		control	-1.2673	1.1400
	tdk inveksi	cluster 1	-3.8117*	.9140
		cluster 2	2.1483	1.3046
		cluster 3	2.5523*	1.1800
		control	1.2650	.9140
control	cluster 1	-5.0967*	.8618	
	cluster 2	.8633	1.2685	
	cluster 3	1.2673	1.1400	
	tdk inveksi	-1.2650	.9140	

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
PIEBER	claster 1	claster 2	.000	-83.2403
		claster 3	.015	2.0712
		tdk inveksi	.003	3.6569
		control	.002	4.0211
	claster 2	claster 1	.000	45.4377
		claster 3	.000	54.0824
		tdk inveksi	.000	55.2555
		control	.000	55.5060
	claster 3	claster 1	.015	-18.0708
		claster 2	.000	-74.7376
		tdk inveksi	1.000	-8.2805
		control	.999	-8.0024
	tdk inveksi	claster 1	.003	-16.4851
		claster 2	.000	-73.5645
		claster 3	1.000	-8.2805
		control	.999	-6.4167
control	claster 1	.002	-16.1156	
	claster 2	.000	-73.3086	
	claster 3	.999	-7.9971	
	tdk inveksi	.999	-6.4114	
PILMP	claster 1	claster 2	.000	-21.8082
		claster 3	.037	.2443
		tdk inveksi	.011	9697
		control	.007	1.1375
	claster 2	claster 1	.000	13.6638
		claster 3	.000	16.9153
		tdk inveksi	.000	17.4520
		control	.000	17.5678
	claster 3	claster 1	.037	-7.5637
		claster 2	.000	-26.3647
		tdk inveksi	1.000	-3.7882
		control	1.000	-3.6597
	tdk inveksi	claster 1	.011	-8.8383
		claster 2	.000	-25.8280
		claster 3	1.000	-3.7882
		control	1.000	-2.8343
control	claster 1	.007	-6.6705	
	claster 2	.000	-25.7122	
	claster 3	1.000	-3.6597	
	tdk inveksi	1.000	-2.9343	

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(i) Cluster Number of Case	(j) Cluster Number of Case	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
P1EBNA	cluster 1	cluster 2	.000	-11.2784
		cluster 3	.000	-32.5548
		tdk inveksi	.261	-.6366
		control	.234	-.5638
	cluster 2	cluster 1	.000	7.2576
		cluster 3	.000	-23.8125
		tdk inveksi control	.000 .000	8.0124 8.0896
	cluster 3	cluster 1	.000	28.8412
		cluster 2	.000	19.1475
		tdk inveksi control	.000 .000	29.6898 29.7532
		tdk inveksi	cluster 1	.261
	cluster 2		.000	-12.1476
	cluster 3		.000	-33.4302
	control		1.000	-1.4486
	control	cluster 1	.234	-2.1778
		cluster 2	.000	-12.0804
cluster 3		.000	-33.3686	
tdk inveksi		1.000	-1.4486	
P1P53	cluster 1	cluster 2	.000	-39.1615
		cluster 3	.048	2.291E-02
		tdk inveksi control	.174 .016	-2.8246 .4051
		cluster 2	cluster 1	.000
	cluster 3		.000	38.1397
	tdk inveksi control		.000 .000	33.0903 36.3793
	cluster 3	cluster 1	.048	-4.3611
		cluster 2	.000	-41.7403
		tdk inveksi control	.004 .891	-5.6227 -2.3163
		tdk inveksi	cluster 1	.174
	cluster 2		.000	-36.0447
	cluster 3		.004	1.1323
	control		.001	1.4812
	control	cluster 1	.016	-3.6845
		cluster 2	.000	-41.2064
		cluster 3	.891	-2.0219
tdk inveksi		.001	-4.8695	

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	Sig.	95% Confidence Interval
				Lower Bound
P1C_MYC	cluster 1	cluster 2	.000	3.3694
		cluster 3	.000	4.0358
		tdk infeksi	.000	1.9450
		control	.000	3.3368
	cluster 2	cluster 1	.000	-8.5506
		cluster 3	.786	-2.6017
		tdk infeksi	.110	-4.8126
		control	.501	-3.4539
	cluster 3	cluster 1	.000	-8.6922
		cluster 2	.786	-3.4097
		tdk infeksi	.039	-4.9622
		control	.275	-3.5955
	tdk infeksi	cluster 1	.000	-5.6784
		cluster 2	.110	-.5159
		cluster 3	.039	.1424
		control	.170	-.5817
control	cluster 1	.000	-6.8567	
	cluster 2	.501	-1.7273	
	cluster 3	.275	-1.0609	
	tdk infeksi	.170	-3.1517	

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval
			Upper Bound
P1EBER	cluster 1	cluster 2	-45.4377
		cluster 3	18.0708
		tdk invekse control	16.4651 16.1156
		cluster 2	63.2403
	cluster 2	cluster 1	74.7376
		cluster 3	73.5845
		tdk invekse control	73.3066 73.3066
		cluster 3	-2.0712
	cluster 3	cluster 1	-54.0824
		cluster 2	8.2805
		tdk invekse control	8.2805 7.9971
		tdk invekse	-3.6569
	tdk invekse	cluster 1	-55.2555
		cluster 2	8.2805
		cluster 3	6.4114
		control	-4.0211
control	cluster 1	-55.5060	
	cluster 2	8.0024	
	cluster 3	6.4187	
	tdk invekse	6.4187	
P1LMP	cluster 1	cluster 2	-13.6638
		cluster 3	7.5637
		tdk invekse control	6.8383 6.6705
		cluster 2	21.8062
	cluster 2	cluster 1	28.3647
		cluster 3	25.8280
		tdk invekse control	25.7122 25.7122
		cluster 3	-2.443
	cluster 3	cluster 1	-16.9153
		cluster 2	3.7882
		tdk invekse control	3.7882 3.6597
		tdk invekse	-9.697
	tdk invekse	cluster 1	-17.4520
		cluster 2	3.7882
		cluster 3	2.9343
		control	-1.1375
	control	cluster 1	-17.5676
		cluster 2	3.6597
		cluster 3	2.9343
		tdk invekse	2.9343

Based on observed means

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval
			Upper Bound
P1EBNA	cluster 1	cluster 2	-7.2576
		cluster 3	-28.9412
		tdk infeksi	2.2808
		control	2.1776
	cluster 2	cluster 1	11.2784
		cluster 3	-19.1475
		tdk infeksi	12.1476
		control	12.0904
	cluster 3	cluster 1	32.5548
		cluster 2	23.8125
		tdk infeksi	33.4302
		control	33.3668
tdk infeksi	cluster 1	.6366	
	cluster 2	-8.0124	
	cluster 3	-29.5988	
	control	1.4486	
control	cluster 1	.5538	
	cluster 2	-8.0696	
	cluster 3	-29.7532	
	tdk infeksi	1.4486	
P1P53	cluster 1	cluster 2	-34.3345
		cluster 3	4.3811
		tdk infeksi	.5536
		control	3.6845
	cluster 2	cluster 1	39.1615
		cluster 3	41.7403
		tdk infeksi	38.0447
		control	41.2064
	cluster 3	cluster 1	-2.2909E-02
		cluster 2	-36.1387
		tdk infeksi	-1.1323
		control	2.0219
tdk infeksi	cluster 1	2.9246	
	cluster 2	-33.0803	
	cluster 3	5.6227	
	control	4.9895	
control	cluster 1	-.4051	
	cluster 2	-36.3793	
	cluster 3	2.3163	
	tdk infeksi	-1.4912	

Based on observed means.

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Cluster Number of Case	(J) Cluster Number of Case	95% Confidence Interval
			Upper Bound
PTC_MYC	cluster 1	cluster 2	8.5506
		cluster 3	8.6922
		tdk infeksi	5.6784
		control	6.8557
	cluster 2	cluster 1	-3.3684
		cluster 3	3.4097
		tdk infeksi	.5159
		control	1.7273
	cluster 3	cluster 1	-4.0358
		cluster 2	2.6017
		tdk infeksi	-.1424
		control	1.0609
	tdk infeksi	cluster 1	-1.9450
		cluster 2	4.8126
		cluster 3	4.9622
		control	3.1517
control	cluster 1	-3.3368	
	cluster 2	3.4539	
	cluster 3	3.5955	
	tdk infeksi	.5817	

Based on observed means.

* The mean difference is significant at the .05 level.



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

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

Nomor : 04/Panke.KKE/2004

Panitia Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mempelajari secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

**" EKSPRESI P 53 Bcl - 2 DAN C-myc PADA KARSINOMA SEL
SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EBV "**

Peneliti Utama : **THERESIA INDAH BUDHY S.**
Unit/Lembaga/Tempat Penelitian : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
RSJD. Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 5 November 2003



Ketua,

Prof. Purnama Soebagyo, drg, MHPed.



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(“ETHICAL CLEARANCE”)**

Nomor : 04/Panke.KKE/2004

Panitia Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mempelajari secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

“ EKSPRESI P 53 Bel - 2 DAN C-myc PADA KARSINOMA SEL
SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EBV ”

Peneliti Utama : **THERESIA INDAH BUDHY S.**
Unit/Lembaga/Tempat Penelitian : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
RSUD. Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 5 November 2003



Kerua,

Prof. Retno Kusumingsih Soebagyo, drg, MIPed.



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(“ETHICAL CLEARANCE”)**

Nomor : 04/Panke.KKE/2004

Panitia Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mempelajari secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

“ EKSPRESI P 53 Bcl - 2 DAN C-myc PADA KARSINOMA SEL.
SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EBV ”

Peneliti Utama : **THERESIA INDAH BUDHY S.**
Uni/Lembaga/Tempat Penelitian : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
RSJ Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 5 November 2003



Ketua,

Prof. Retno Laksminingati Soebagyo, drg, MHPed.



**PANITIA KELAIKAN ETIK
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(“ETHICAL CLEARANCE”)**

Nomor : 04/Panke,KKE/2004

Panitia Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah mempelajari secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian berjudul :

**“ EKSPRESI P 53 Bcl - 2 DAN C-myc PADA KARSINOMA SEL
SKUAMOSA RONGGA MULUT YANG TERINFEKSI EBV ”**

Peneliti Utama : **THERESIA INDAH BUDHY S.**
Unit/Lembaga/Tempat Penelitian : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
RSUD. Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 5 November 2003

Ketua,

Dr. R. Soemingsih Soebagyo, drg, MHPed.
