

## **BAB 2** **TINJAUAN PUSTAKA**

### **2.1 Karsinoma Sel Skuamosa Rongga Mulut**

Sebanyak 91% dari seluruh kanker di rongga mulut adalah karsinoma sel skuamosa rongga mulut.<sup>(1)</sup> Karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) - merupakan bagian dari kanker di daerah kepala dan leher yang menempati peringkat 10 kanker terbanyak di dunia dengan distribusi geografis yang luas<sup>(12)</sup> dan secara signifikan menyebabkan morbiditas maupun mortalitas<sup>(13)</sup>. Berbagai literatur memperlihatkan variasi klasifikasi yang dipakai untuk menggambarkan kanker mulut sehingga menyulitkan untuk menginterpretasikan data epidemiologinya. Biasanya kanker mulut didefinisikan sebagai kanker yang berasal dari seluruh mukosa rongga mulut, tonsil, faring dan laring tetapi tidak termasuk kanker yang berasal dari bibir.

Kanker mulut termasuk di dalam sepuluh kanker yang paling sering terjadi di seluruh dunia<sup>(14)</sup>, dimana pada 2003 kanker mulut menempati peringkat ke-delapan<sup>(2)</sup>. Prevalensi kanker mulut cenderung tinggi pada pria dan pada negara berkembang. Insidensi kanker mulut di Asia per 100.000 populasi mempunyai rentang antara 0,7 di China dan 12,6 di India.<sup>(2)</sup>

#### **2.1.1 Etiologi**

Insidensi KSSRM yang tinggi dan bervariasi pada lokasi dan kelompok etnik yang berbeda berhubungan langsung dengan kebiasaan yang merupakan faktor resiko kanker mulut seperti penggunaan tembakau, menyirih dan konsumsi alkohol<sup>(1, 2)</sup>. Sebanyak 80% dari pasien kanker mulut adalah perokok<sup>(15)</sup>. Prevalensi konsumsi tembakau telah menurun di negara maju, namun pada negara dengan pendapatan rendah atau sedang pengonsumsi tembakau semakin meningkat, khususnya di antara remaja dan wanita.<sup>(2)</sup>

Tembakau mengandung karsinogen yang potensial meliputi *nitrosamines (nicotine)*, *polycyclic aromatic hydrocarbons*,

*nitrodictanolamine*, *nitrosoproline*, dan *polonium*. Asap tembakau mengandung karbonmonoksida, *thiocyanate*, *hydrogen cyanide*, *nicotine* dan metabolit dari kandungan ini<sup>(16)</sup>.

Lebih dari 250 juta penduduk Asia Tenggara menggunakan *smokeless tobacco*; 95% berada di India dan Bangladesh (13%), sementara di Indonesia distribusi pengguna *oral tobacco* sebesar 0,8% dari 212 juta penduduk (WHO). Di India, jumlah diagnosa kanker yang berhubungan dengan penggunaan tembakau diperkirakan 250.000 kasus per 700.000 hingga 900.000 dari kanker yang terdiagnosa (2001)<sup>(15)</sup>

Semua bentuk alkohol dapat menyebabkan kanker mulut, termasuk alkohol yang terkandung di dalam *mouthwash*. Alkohol dapat berperan secara independen dan bereaksi sinergis dengan tembakau dalam karsinogenesis dengan cara memberikan efek dehidrasi pada mukosa, sehingga meningkatkan permeabilitas mukosa yang terpajan bahan karsinogen yang terkandung di dalam alkohol dan rokok. Telah diperkirakan bahwa perokok menggunakan *mouthwash* lebih sering.<sup>(16)</sup> Faktor lain yang juga berperan dalam terjadinya KSSRM meliputi kebiasaan menyirih, pajanan sinar UV, faktor nutrisi, faktor genetik, infeksi *Human Papilloma Virus*, *Herpes Simplex Virus* dan *Candida*.

### 2.1.2 Patogenesis

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut terjadi akibat adanya proses perubahan sel yang bertahap dari normal menjadi lesi displastik hingga akhirnya menjadi karsinoma sel skuamosa. Lesi premalignansi atau prekanker didefinisikan oleh WHO sebagai jaringan yang berubah secara morfologis. Lesi yang termasuk dalam klasifikasi ini adalah leukoplakia dan eritroplakia, sedangkan lichen planus lebih diklasifikasikan sebagai suatu kondisi dengan potensi menjadi malignan.<sup>(13)</sup>

Secara histopatologis, lesi premalignan dapat memperlihatkan adanya displasia dengan kategori dengan ringan, sedang dan berat. Berdasarkan kriteria histomorfologis, displasia ringan memiliki sel displastik yang terbatas pada lapisan basal epitelium; sementara perubahan pada displasia sedang dan berat meliputi perubahan morfologi seluler dan

peningkatan ketebalan lapisan epitel sebanyak 2/3 sampai 3/4 ketebalan lapisan epitel. *Carcinoma in-situ* adalah lesi di mana sel abnormal meliputi seluruh epitel tanpa menginvasi membran dasar. Suatu KSSRM terdiagnosis ketika terdapat kerusakan membran dasar dan invasi sel epitel displastik menuju jaringan ikat. Keberadaan dan keparahan displasia diperkirakan berhubungan dengan peningkatan resiko ke arah keganasan.<sup>(13)</sup>

Karsinoma sel skuamosa rongga mulut dapat berkembang di tempat yang sebelumnya terdapat leukoplakia dan eritroplakia atau dapat berkembang secara de novo. Secara klinis, lesi memiliki tampilan lesi prakanker pada tahap awal karsinogenesis. Ketika telah menginvasi submukosa, KSSRM tampak sebagai ulserasi kronis yang ireguler, dengan tepian yang meninggi dan terdapat indurasi.<sup>(13)</sup>



*Gambar 2.1 Karsinoma sel skuamosa tahap lanjut pada lidah dan dasar mulut dengan metastasis mencapai nodus limfa regional*

Gambar diambil dari: Essential of Oral Medicine. London: BC Decker Inc: 2001

Seperti kanker di tempat lain, KSSRM dikelompokkan secara klinis sebagai dasar pembuatan rencana perawatan. Sistem staging yang digunakan merupakan klasifikasi tumor-nodemastasis (TNM). T menunjukkan ukuran tumor, N menggambarkan ada atau tidaknya lesi yang bermetastasis ke nodus limfa dan M menunjukkan ada atau tidaknya metastasis yang jauh ke beberapa organ atau lokasi. Lokasi yang paling sering terkena adalah paru-paru.<sup>(13)</sup>

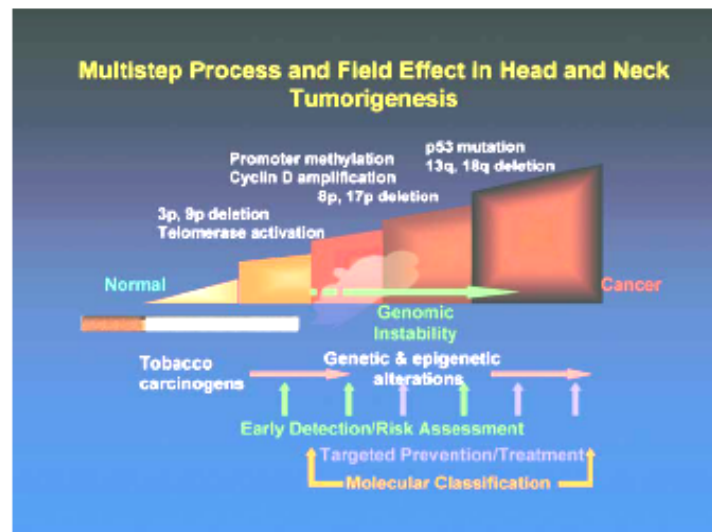
### 2.1.3 Aspek molekuler pada karsinogenesis KSSRM

Karsinogenesis merupakan proses genetik yang memicu perubahan morfologi dan tingkah laku seluler. Analisis perubahan di tingkat molekuler

dapat menjadi alat diagnosis utama dan pemandu untuk melakukan perawatan, karena perubahan morfologis terjadi setelah adanya perubahan genetik.<sup>(16)</sup> Kanker dan lesi prakanker rongga mulut berkembang sebagai akibat dari siklus sel yang tidak terkontrol yang dikarenakan *multiple mutations*. *Proto-oncogene*, *tumor suppressor gene* (TSG), dan molekul *gatekeeper* (*cyclins* dan CDK) merupakan kelompok gene DNA perbaikan yang dapat bermutasi di karsinoma sel skuamosa.<sup>(13)</sup> Untuk menonaktifkan TSG dibutuhkan *loss of heterozygosity* (LOH) atau *two-hit-hypothesis* (Knudson's *hypothesis*) yang menyatakan bahwa dalam inaktivasi *tumor suppressor gene*, kedua alel harus bermutasi.<sup>(16-18)</sup> LOH telah dilaporkan terjadi pada kromosom 3p, 4q, 9p, 11q dan 17p.<sup>(16)</sup>

Pada lesi dengan perubahan histologis ringan, seperti hiperplasia dan displasia ringan, delesi satu dari dua alel pada kromosom 3p dan 9p21 merupakan kejadian yang paling sering terjadi. Bahkan, peristiwa tersebut juga terlihat pada epitel normal. Karena pada regio kromosom 3p14 dan 9p21 terdapat *tumor suppressor gene*, adanya delesi akan mempengaruhi terjadinya transformasi menuju keganasan. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang menyatakan bahwa pada leukoplakia rongga mulut dengan delesi pada 3p14 dan 9p21, risiko untuk transformasi menuju keganasan menjadi lebih tinggi.<sup>(19)</sup>

Perbanyakan gen dan overekspresi protein ditemukan pada karsinoma sel skuamosa kepala dan leher, contohnya adalah Cyclin D yang sering teramplifikasi dan overekspresi pada tahap awal tumorigenesis (Izzo et al 2003). Tumor suppressor gene p53 adalah gen yang paling sering termutasi pada KSSRM dengan frekuensi mencapai 50% kasus. Perubahan genetik lain pada KSSRM juga telah diidentifikasi pada kromosom 4, 8 dan 11.<sup>(19)</sup>



Gambar 2.2 Diagram patogenesis molekuler kanker pada kepala dan leher  
Gambar diambil dari: Focus on Head and Neck Cancer, Cancer Cell, April 2004

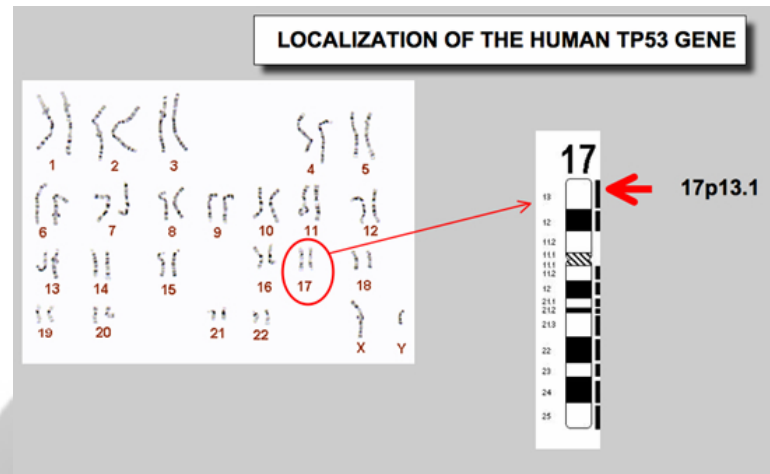
Pada lesi kanker, proses siklus sel menjadi tidak terkontrol. Peningkatan siklus sel biasanya merupakan akibat dari banyaknya mutasi yang terjadi pada berbagai gen yang mengatur pembelahan sel. Banyak dari kelainan molekuler ini, terutama delesi DNA dan amplifikasi gen, adalah akibat dari ketidakstabilan genomik. Memahami mekanisme ketidakstabilan genomik akan menciptakan strategi preventif atau terapeutik dalam mencegah atau mengurangi ketidakstabilan tersebut<sup>(19)</sup>

## 2.2 Tumor Suppressor Gene (TSG)

Terdapat kelompok gen yang mengkodekan protein dengan efek negatif dalam pembelahan sel yang dikenal sebagai *tumor suppressor gene* (TSG). Produk gen ini menghambat siklus sel saat kerusakan DNA terjadi. Kerusakan ini dapat berkembang sebagai konsekuensi dari pemaparan karsinogen atau infeksi oleh virus onkogenik. Jika kerusakan parah dan tidak dapat diperbaiki, protein *tumor suppressor gene* akan menekan sel sehingga mencapai kematian sel terprogram atau apoptosis. Salah satu produk gen utama adalah p53 yang diaktivasi ketika terjadi kerusakan DNA.<sup>(13)</sup>

### 2.2.1 Gen P53.

Gen p53 pada manusia terdiri dari 19.200 bp, lebih dari 11 ekson (GenBank Accession Number: NC\_000017), dan terletak di kromosom 17p13.1<sup>(10)</sup>. Gen p53 terdiri dari 393 asam amino. Nama p53 diturunkan dari “p” untuk protein, dan “53” karena memiliki massa molekuler sebesar 53,000 unit masa atom.<sup>(20)</sup>



Gambar 2.3 Lokasi gen p53 pada kromosom 17

Gambar diambil dari [http://p53.free.fr/p53\\_info/p53\\_gene.html](http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html)

*TP53* merupakan *gatekeeper tumor suppressor gene*<sup>(21)</sup> yang beraksi sebagai pertahanan utama melawan kanker<sup>(22)</sup> dan seringkali diaktivasi oleh banyak sinyal stress.<sup>(8)</sup> p53 berfungsi sebagai pengaktivasi proses transkripsi, perbaikan DNA, *apoptosis*, *senescence*, penghambat siklus sel pada G<sub>1</sub> dan G<sub>2</sub><sup>(16)</sup>, serta menekan beberapa gen salah satunya adalah hTERT.<sup>(8)</sup> Beberapa faktor yang mempengaruhi pilihan respon sel yang terjadi adalah tipe sel, ada tidaknya faktor *survival* pada lingkungan luar, tingkat kerusakan DNA dan level p53 (Chen *et al.*, 1996)<sup>(23)</sup>.

Pada sel yang tidak mengalami tekanan, p53 dijaga untuk inaktif. Beberapa isoform p53 juga dapat memodulasi aktivitas p53. Apabila terjadi kerusakan DNA, p53 dengan cepat berakumulasi dan teraktivasi. (Kastan *et al.*, 1991; Lu dan Lane, 1993). Beberapa proses lain yang dapat mengaktivasi p53, adalah fosforilasi, glikosilasi, keberikatan pada protein regulatorik, *alternative splicing* dan asetilasi (Gu dan Roeder, 1997; Siliciano *et al.*, 1997; Giaccia dan Kastan, 1998).<sup>(23)</sup>

Abnormalitas *tumor suppressor gene* telah dilaporkan pada semua jenis kanker dan mutasi p53 (mutant p53) ditemukan terdapat pada hampir 50% kanker(24) dan sebagian besar karsinoma sel skuamosa rongga mulut. Mutasi dapat menyebabkan hilangnya aktivitas p53 atau dengan hilangnya sinyal sel secara *upstream* atau *downstream* terhadap p53.<sup>(25)</sup> Hilangnya kemampuan p53 menyebabkan imortalisasi sel dan kecenderungan sel untuk bertransformasi menjadi neoplasma.<sup>(26)</sup>

Tujuh puluh persen mutasi pada p53 merupakan *missense mutation*. Mutasi jenis ini menghasilkan penurunan aktivitas pengikatan DNA dan hilangnya berbagai fungsi yang dimediasi oleh transkripsi gen p53, seperti penghentian siklus sel, apoptosis, inhibisi vaskularisasi kapiler dan restorasi DNA. Konsekuensinya, sel bertransformasi menuju keganasan, terlibat di dalam imortalisasi, mengalami bertambahnya perbanyakan sel dan ketidakstabilan kromosom DNA. Variasi *missense mutation* dari p53 sangat banyak dan pada tahun 2004 telah dilaporkan 1000 macam substitusi asam amino pada berbagai literatur. Variasi mutasi p53 mencerminkan keragaman sifat individual kanker yang diperoleh.<sup>(24)</sup>

Selain mutasi pada p53, dilaporkan juga adanya *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada kodon 72 dengan substitusi asam amino. Tipe 72P dari CCC mengkode proline dan tipe 72R dari CGC mengkode arginine. Tipe 72P dikaitkan dengan prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan 72R pada kanker paru, namun sebaliknya pada kanker payudara.<sup>(24)</sup>

Pada sel galur karsinoma sel skuamosa rongga mulut tipe HSC-3 dan HSC-4 ditemukan mutasi p53 dengan sifat yang berbeda. Pada HSC-3 ditemukan mutasi berupa insersi 4 pasang basa TAAG di kodon 305-306 dan memiliki SNP 72P (mengkode proline). HSC-4 memiliki mutasi berupa *missense mutation* pada kodon 248 dan memiliki SNP 72R (mengkode arginin). Berdasarkan penelitian Yoko Kamiya dan Tomoko Ohsima, terdapat perbedaan ekspresi level protein p53 yang diukur menggunakan ELISA pada HSC-3 dan HSC-4. Tidak terdapat ekspresi protein p53 pada HSC-3 atau bisa diklasifikasikan sebagai p53 (-), sebaliknya ekspresi protein p53 yang tinggi nampak pada HSC-4 dan diklasifikasikan sebagai p53 (+).<sup>(24)</sup>



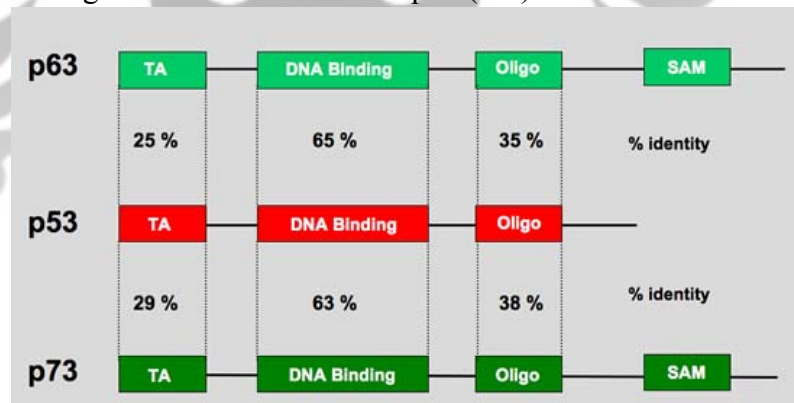
Tabel 2.1 Analisis Mutasi p53 dan SNP pada kodon 72 pada sel galur dengan mutasi p53 ( tipe HSC-3 dan HSC-4) <sup>10</sup>

Sel galur	ekson	kodon	Perubahan basa (asam amino)	Mutasi	SNP pada kodon 72
HSC-3	8	305-306	Insersi TAAG	Insersi 4bp	CCC (P)
HSC-4	7	248	CGG(R)→CAG (Q)	Missense	CGC (R)

### 2.3 Gen dan Protein p73

Sebagian besar gen sebenarnya adalah anggota dari *gene family*. Pada tahun 1997, Caput dan *coworker* telah mengidentifikasi *human homolog* dari p53 yang disebut p73. P73 terletak pada kromosom 1p36, regio yang sering menunjukkan *loss of heterozygosity*, termasuk neuroblastoma. <sup>(6)</sup>

P73 berbagi lebih dari 60% keidentikan asam amino dengan regio DNA binding p53, termasuk konservasi dari seluruh kontak DNA dan residu struktural yang merupakan lokasi tersering mutasi p53 pada tumor. Selain itu, p73 berbagi 38% keidentikan dengan domain tetramerisasi p53 dan 29% keidentikan dengan domain transaktivasi p53 (TA).



Gambar 2.4 Persamaan pada p53 gene family. p73 dan p53 memiliki 29% kesamaan di domain TA (transactivation), 63 % di domain DNA binding dan 38% di domain oligomerisasi

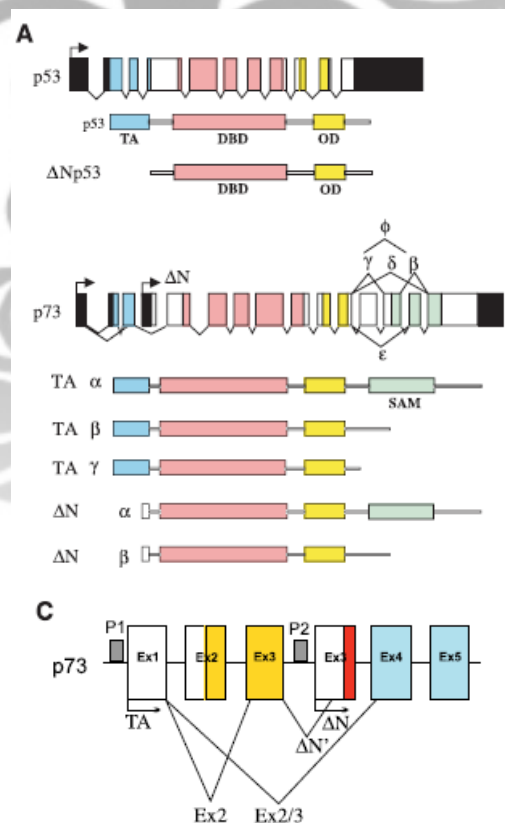
Gambar diambil dari [http://p53.free.fr/p53\\_info/p73\\_p63.html](http://p53.free.fr/p53_info/p73_p63.html)



### 2.3.1. Struktur

Tidak seperti gen p53, yang hanya menunjukkan sedikit *alternative splicing*, p73 menimbulkan kompleksitas pada berbagai isoform protein karena penggunaan alternative promoter dan *differential mRNA splicing*<sup>[31]</sup>. Berbagai isoform dari p73 adalah hasil dari *alternative splicing* dari C-termini dan penggunaan dua promoter yang berbeda (Irwin and Kaelin, Melino *et al*)<sup>(9)</sup>.

Gen p73 diekspresikan dalam beberapa bentuk yang berbeda jauh, baik pada C- atau N- terminus<sup>281</sup>. Kebanyakan *alternative splicing* terjadi pada ujung 3', meliputi exon 10 hingga 13 dan menciptakan *transcript* yang mengkode isoform protein dengan struktur C-terminal yang berbeda<sup>[31]</sup>. *Differential splicing* dari ujung 3' gen ini akan mengekspresikan beberapa varian p73 *C-terminal splice* yang berbeda secara *in vitro* dalam potensinya untuk mengaktivasi p53-*responsive genes* sehingga memiliki sifat fungsional yang berbeda.<sup>[28]</sup>



Gambar 2.5 A. arsitektur gen kerabat p53. baik p73 maupun p53 terdiri dari domain oligomerisasi, TA dan DBD. Seluruh gen terekspresikan menjadi dua bagian besar: protein lengan panjang yang mengandung domain TA dan ΔNp73 yang kehilangan domain TA. C.

*arsitektur gen dari NH2-terminus p73. TAp73 dihasilkan dari promotor p1, sementara ΔNp73 dihasilkan dari promotor p2 pada intron 3*

Gambar diambil dari: P63 and p73: roles in Development and Tumor Formation  
Mol Cancer Res 2004;2(7). July 2004

Dua varian p73 dengan perbedaan pada N-terminus dihasilkan dari penggunaan dua promotor p73 yang berbeda. Salah satunya berlokasi *upstream* dari exon 1 dan satu lagi berada *upstream* dari exon 3' [28]. Dengan begitu, variasi bentuk dari N-terminus p73 dapat dibagi menjadi dua kelas. Pertama, bentuk lengan panjang atau TA yang merupakan bentuk yang paling mirip dengan p53. Kemudian, ΔNp73 atau lengan pendek, yaitu kelas ke dua dari protein p73 yang kekurangan domain transaktivasi N-terminus yang ditemukan pada TAp73<sup>(7)</sup>.

Protein TAp73 dapat menginduksi kematian sel, paling tidak melalui aktivasi *downstream target genes* yang penting dalam mediasi penghentian siklus sel dan apoptosis. Sementara, protein ΔNp73 tidak dapat mengaktifkan downstream target genes yang diaktivasi oleh TAp73 dan p53, sebagai hasilnya, protein ΔNp73 tidak dapat menginduksi apoptosis, namun justru memiliki sifat antiapoptosis. Bahkan, ΔNp73 berfungsi sebagai '*dominant negative inhibitor*' yang dapat menghambat fungsi lengan panjang dari p73 dan p53. <sup>(9)</sup>

Data yang ada saat ini menunjukkan bahwa berbagai bentuk TA dan Np73 diatur secara ketat selama tumorigenesis dan pertumbuhan. Pada sel kanker, rasio relatif TAp73: ΔNp73 sangat penting dalam responnya terhadap berbagai tipe stres, seperti kerusakan DNA atau pengaturan *growth factor*. Pada beberapa sel non malignan, perubahan level ekspresi pada protein p73 yang berbeda dapat memicu tumorigenesis<sup>[7]</sup>. Aktifitas final bentuk TA diatur secara ketat oleh jumlah ΔN yang berada di dalam sel. <sup>[28]</sup>

### 2.3.2 Fungsi p73

Gen p73 yang merupakan homolog pertama dari *tumor supresor* p53 berkerja sebagai faktor transkripsi. Isoform TAp73 mampu berikatan secara spesifik dengan DNA melalui p53 *responsive element* (RE) dan

mengaktivasi transkripsi gen target. Seperti pada p53, aktivasi tersebut dapat menginduksi penghentian siklus sel pada G1/S dan juga apoptosis. Sebaliknya, isoform  $\Delta N$  memberikan efek dominan negatif terhadap aktivitas p53 dan p73. Isoform  $\Delta Np73$  juga mampu secara langsung mengaktivasi gen target spesifik yang tidak diinduksi oleh isoform TA<sup>(10)</sup>. Dengan demikian, p73 dapat bertindak sebagai tumor suppressor sekaligus onkogen.

P73 juga memiliki peran dalam pertumbuhan. Ekspresi p73 dibutuhkan untuk neurogenesis dari struktur neural spesifik, sinyal feromonal, dan dinamika cairan normal dari cairan serebrospinal.<sup>(27)</sup>

### 2.3.3 Ekspresi p73 pada jaringan normal

Di bawah kondisi fisiologis normal, level ekspresi protein p73 dijaga pada level yang sangat rendah, sehingga menjaga protein pro-apoptosis ini dalam keadaan inaktif. P73 secara predominan diregulasi pada level *post-translational*, dan stabilisasi p73 menghasilkan penghentian siklus sel pada G1/S atau kematian sel melalui apoptosis. Dengan demikian, stabilisasi p73 secara langsung berhubungan dengan aktivitasnya. Serupa dengan p53, p73 terinduksi untuk stabil pada level protein pada responnya terhadap kemunculan agen perusak DNA dan kemudian menggunakan aktivitas pro-apoptosisnya.<sup>(29)</sup>

*P53 family member* tidak hanya menginduksi sejumlah target gen yang dikenal tapi juga dapat meregulasi ekspresi masing-masing. P53 dan TAp73 dapat berikatan ke promoter  $\Delta Np73$  (P2) dan menginduksi transkripsinya. Sebaliknya,  $\Delta Np73$  dapat menghambat aktivitas p53 dan TAp73 dengan berkompetisi pada lokasi promoter dan langsung mengikat proteinnya. Sehingga tercipta umpan balik negatif.<sup>(10)</sup>

Meskipun setiap protein dan isoformnya diekspresikan dalam level yang berbeda tergantung pada jenis jaringan dan tahap perkembangannya, keberadaan isoform dalam level yang rendah tidak berarti insignifikan. *p53 family member* dan isoformnya dapat berikatan secara berbeda pada promoternya dan terbukti bahwa rasio antar isoform menentukan masa depan suatu sel.<sup>(10)</sup>

#### 2.3.4. Penghambatan p73 oleh mutan p53

Derajat homolog yang tinggi antar kedua domain oligomerisasi dari p53 dan p73 memperlihatkan kemungkinan bahwa protein-protein tersebut dapat membentuk homotetramer. Domain inti dari mutan p53 mampu berhubungan dengan *wild type* p73, namun dibutuhkan baik ikatan DNA spesifik maupun domain oligomerisasi dari p73.<sup>(28)</sup>

Salah satu karakteristik p53 yang dibutuhkan untuk berikatan dengan p73 adalah pengenalan dengan antibodi monoklonal PAb240 yang mengenali domain inti p53 dalam konformasi mutan. Domain inti p53 awalnya dianggap sebagai 'dead' domain karena tidak mampu berikatan dan mengaktifasi target gen p53, namun dalam mutan p53, domain inti tersebut dapat memiliki fungsi untuk memusnahkan dan menginaktivasi protein seperti p73. Protein mutan p53 ini dapat berikatan ke TAp73 dan menghambat fungsi proapoptosisnya. Mutant p53 menghambat aksi tumor supresor dari p73 dengan cara dominan negatif dengan menciptakan *defective heterooligomeer* dengan *wildtype* p73.<sup>(28)</sup>

Kekuatan interaksi antara p73 dan p53 lebih jauh lagi dipengaruhi oleh keberadaan polimorfisme pada p53 kodon 72.<sup>(29)</sup> Protein p53 mutan dengan arginine pada residu 72 (R72) lebih kuat berikatan dan menginaktivasi p73. Alel Arg secara khusus termutasi dan bertahan pada tumor sel skuamosa pada kulit dan vulva yang tumbuh dalam Arg/Pro germline heterozygote. Penemuan tersebut menunjukkan inaktivasi p73 oleh mutan p53 tertentu dapat menyediakan keuntungan selektif dalam memicu tumorigenesis<sup>(28)</sup>. Dalam situasi tertentu, kehilangan p73 dapat menimbulkan kanker dan aktivasi ekspresi p73 juga dapat memicu tumorigenesis. Paradoks ini dijelaskan oleh fakta bahwa p73 meng-*encode* isoform *putative tumor suppresor* (TA) maupun *putative oncogene* (N) 73.<sup>(9)</sup>

Reduksi potensi apoptosis p73 oleh mutant p53 tidak dapat disamaratakan pada semua kasus overekspresi p73. Meskipun pada sample kanker esofagus defek p53 secara signifikan berkorelasi dengan peningkatan

ekspresi p73, beberapa studi pada tumor primer gagal untuk menemukan korelasi signifikan antara status mutasi p53 dengan overekspresi p73.<sup>(28)</sup>

#### 2.3.5. P73 dan kanker

Mutasi p73 hanya terdeteksi kurang dari 0,5% pada kanker, sementara 50% kanker mengalami mutasi p53<sup>(5, 29)</sup>. Meskipun jarang terjadi mutasi p73, ekspresi dan fungsi dari isoform-isoform p73 sangat jelas berubah pada beberapa kanker. Banyak yang melaporkan bahwa level protein dan mRNA p73 lebih tinggi pada jaringan tumor dibandingkan dengan jaringan sekitarnya yang normal. Sayangnya, hanya sedikit dari studi awal ini menggunakan *reagent* yang dapat memisahkan bentuk lengan panjang TA dari p73 dan bentuk N yang lebih pendek.

Terdapat pula laporan yang mendeskripsikan penurunan level p73 dan inaktivasi fungsi p73 pada beberapa kanker. Misalnya, level p73 yang menurun dalam beberapa keganasan hematologik. Terjadi LOH pada lokus gen p73 dan inaktivasi p73 pada beberapa leukemia dan limfoma.<sup>(9)</sup>

Meskipun level ekspresi p73 demikian rendah sehingga proteinnya sering sulit dideteksi dengan analisis Western Blot, ekspresi p73 pada kanker sangat bervariasi dan beberapa sel galur tumor dan tumor primer mengekspresi level yang mudah dideteksi (Stiewie dan Putzer, tidak dipublikasikan).<sup>(28)</sup>

Aktivitas supresi tumor oleh p73 diperkirakan memiliki peran penting dalam jaringan tertentu. Berdasarkan spektrum tumor pada tikus mutan p63 dan p73, gen tersebut memiliki lokasi aksi yang khas. Spektrum tumor yang terdeteksi pada tikus mutan p63 dan p73 cukup berbeda dengan *p53-deficient mice* (Jacks et al, 1994). Bila tikus mutan p53 secara primer mengembangkan *thymic lymphoma* dan *sarcoma*, tikus mutan p63 dan p73 secara primer mengembangkan karsinoma dan lebih sedikit sarkoma. Hal ini diperkirakan dipengaruhi oleh pola ekspresi dari p63 dan p73.<sup>(11)</sup>

Apabila p53 sedikit sekali diekspresikan pada sel epitel, maka sebaliknya p63 dan p73 sangat terekspresikan pada jaringan epitel yang merupakan lokasi perkembangan karsinoma. Hal ini menunjukkan bahwa p73

dan p63 memiliki spesifitas jaringan terhadap epithelial solid tumor dibandingkan dengan p53. <sup>(5,11)</sup>

Lebih jauh lagi, p73 memiliki peran dalam perubahan keganasan pada karsinoma sel skuamosa. Kehilangan fungsional p73 dikaitkan dengan karsinoma sel skuamosa karena perubahan dari tahap inisiasi hingga malignan pada tikus model diikuti dengan kehilangan sporadik yang nyaris total pada mRNA p73 dan ekspresi proteinnya, dengan hanya sedikit penurunan pada ekspresi protein p63. <sup>(5)</sup>

Manipulasi langsung terhadap p73 dapat mengubah sifat sel epidermal, dan kehilangan p73 mampu memicu perubahan menuju karsinoma sel skuamosa. Rekonstitusi fungsi p73 dapat menekan formasi tumor, mendukung pendapat bahwa restorasi fungsi p73 adalah target rasional untuk terapi molekuler karsinoma sel skuamosa. <sup>(5)</sup>

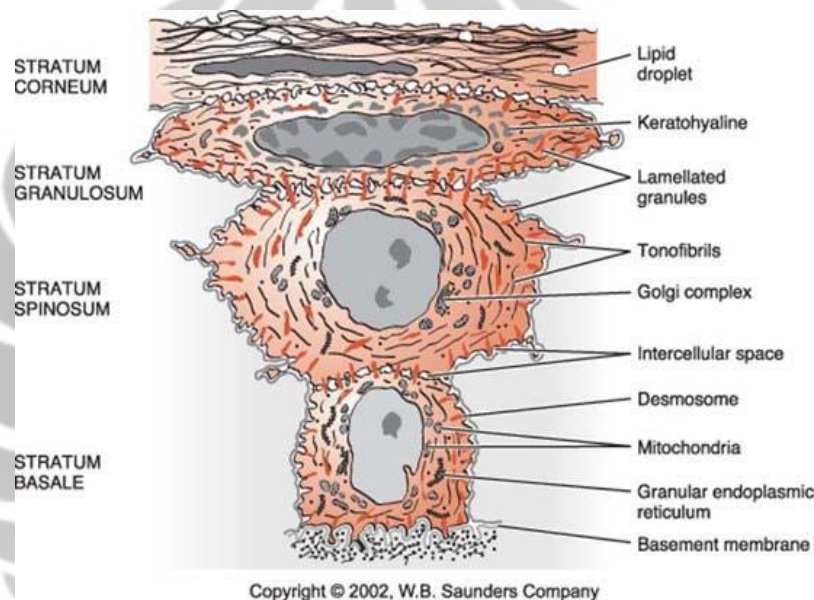
Aktivasi p73 mencukupi untuk memicu apoptosis pada sel kanker, bahkan menyebabkan regresi tumor pada tikus, tanpa memperhatikan status p53. Hal ini menarik, mempertimbangkan bahwa p53 termutasi dalam 50% kanker dan inaktif secara fungsional hingga 90%, sehingga sulit untuk direaktivasi sebagai target terapi. <sup>(5)</sup>

Meningkatkan jumlah relatif dari isoform proapoptosis p73 dan mengurangi isoform antiapoptosis p73, atau mutan p53 yang menginaktivasi p73, dapat diharapkan untuk meningkatkan khasiat kemoterapi yang membutuhkan jalur dependen utuh dari TAp73 untuk menginduksi apoptosis. Terapi ini terbatas pada pasien yang tumornya mengekspresikan salah satu bentuk mutan p53 yang diketahui berinteraksi dengan TAp73. <sup>(9)</sup>

## 2.4 Jaringan Gingiva Normal

Gingiva merupakan bagian dari mukosa oral yang melindungi prosesus alveolaris pada rahang dan mengelilingi daerah sekitar leher gigi. Secara anatomis, gingiva terbagi menjadi tipe *marginal gingiva*, *attached gingiva*, dan area interdental. Gingiva terdiri dari jaringan epitel skuamosa berlapis. Ada tiga area berbeda berdasarkan morfologi dan fungsinya: *oral* atau *outer epithelium*, *sulcular epithelium*, dan *junctional epithelium*.

Gingiva mempunyai lapisan dengan karakteristik dari epitelium skuamosa, yang terdiri dari sel yang berlekatan sangat erat satu sama lain dan tersusun dalam lapisan yang berbeda yang disebut strata<sup>(30)</sup>, yaitu (1) Sel basal atau sel formatif yang dari lapisan sel kolumnar atau kuboidal, (2) Sel prickle atau lapisan spinosa dari sel-sel poligonal, (3) Lapisan granular (stratum granulosum), di mana sel-selnya datar dan mengandung banyak partikel keratohialin, dan (4) Lapisan kornifikasi (stratum korneum) dimana sel-selnya terkeratinisasi atau parakeratinisasi.<sup>(31)</sup> Tipe sel yang paling penting pada epitel gingiva adalah keratinosit. Selain itu terdapat sel-sel nonkeratinosit yang meliputi sel-sel Langerhans, sel Merkel dan melanosit.



Gambar 2.5 Gambaran sel dari berbagai lapisan epitelium skuamosa dilihat menggunakan mikroskop elektron.

Gambar diambil dari: Carranza Clinical Periodontology, 9<sup>th</sup> ed, 2002 W.B Saunders Company

#### 2.4.1 Komponen Molekuler Jaringan Gingiva

Secara morfologis, sitoskeleton pada sel epitel terdiri dari tiga komponen yang berbeda yaitu mikrofilamen, filamen intermediat, dan mikrotubulus. Komponen protein yang terdapat di dalam mikrofilamen adalah *actin*, *myosin*, dan protein yang berhubungan seperti *tropomyosin*, *troponin*, *α actinin* dan *filamin*. Di dalam mikrotubulus, protein yang dominan adalah tubulin.<sup>(33)</sup> Filamen intermediat merupakan unsur penting pada sel yang sering mendapatkan stres mekanik. Berbeda dengan unsur-unsur sitoskeleton lain,



filamen dalam filamen intermediat adalah struktur yang sangat stabil. Tidak terdapat bukti adanya kelompok protein filamen intermediat dapat terurai dan tersusun secara reversibel. Pada sel epitel, filamen yang ditemukan adalah filamen keratin.<sup>(32, 33)</sup>

Protein keratin tersusun dari subunit-subunit polipeptida berbeda yang dapat dikenali dengan nilai isoelektrik dan berat molekul mereka. Polipeptida keratin K1 yang berberat molekul 68 KDa merupakan komponen yang paling utama pada lapisan korneum. Protein lain yang bukan termasuk keratin yang disintesis selama proses maturasi, yang paling banyak dipelajari adalah *keratolinin* dan *involucrin*. Terdapat pula *fillagrin* yang berperan sebagai precursor yang di dibungkus kedalam granula keratohyalin. Pola-pola imunohistokimia dari tipe-tipe keratin, *keratolinin*, *involucrin*, dan *fillagrin* berubah dibawah pengaruh stimulus normal atau patologis yang akan berpengaruh terhadap porses keratinisasi<sup>(34)</sup>

Di dalam epitel terdapat berbagai jenis protein yang sudah terdeteksi. Epitel jenis pertama yaitu epitel rongga mulut atau *outer epithelium* yang berperan melindungi permukaan terluar dari *marginal gingiva* dan permukaan *attached gingiva*. Pada lapisan ini terdapat keratinisasi, parakeratinisasi atau kombinasi dari keduanya. Keratin K1, K2, dan K10-12 merupakan tipe spesifik dari differensiasi epidermal yang secara imunohistokimia diekspresikan dengan intensitas tinggi pada area orthokeratinisasi dan sedikit pada area parakeratinisasi.<sup>(34)</sup>

Pada tipe kedua, epitel sulkular, berada pada batas sulkus gingiva, memiliki lapisan yang tipis dan merupakan epitel skuamosa berlapis nonkeratin. Bagian ini membentang dari batas mahkota sampai *junctional* epitel puncak margin gingiva. Sama seperti epitel nonkeratin, terdapat sedikit granulosum, stratum korneum dan K1, K2, serta sitokeratin K10-K12, namun di dalamnya terkandung K4 dan K13 serta mengekspresikan K19.<sup>(34)</sup>

Lapisan *junctional epithelium* terdiri dari *collarlike band* atau epitel skuamosa berlapis nonkeratin. Lapisan ini terdiri dari 3 atau 4 lapisan tebal pada awal kehidupan dan meningkat menjadi 10-20 lapis seiring dengan meningkatnya usia. Sel-sel bagian ini terbagi menjadi dua jenis: basal dan

suprabasal<sup>(34)</sup>. Polipeptida berbeda diekspresikan pada lapisan ini, seperti K19, K5 dan K14<sup>(34)</sup>

Sel mampu berlekatan dengan sel-sel lainnya dengan mekanisme adhesi sel. Kontak adhesi sel terdiri dari protein perlekatan intraseluler (*intracellular attachment protein*) dan protein penghubung antar-membran (*transmembrane linker protein*)<sup>(33)</sup> Empat kelas protein transmembran adalah cadherins, integrins, ICAMs (*intercellular adhesion molecules*) dan selectins.

Pada fibroblast, dapat terjadi *nonjunctional cell-matrix contacts*. Hal ini dinamakan *extracellular matrix (ECM) contacts*. ECM terdiri dari berbagai macam protein dan polisakarida yang diserap dari serum atau disekresikan secara lokal oleh sel. Dua kelas makromolekul utama yang diidentifikasi di dalam matriks ekstrasel adalah Glycosaminoglycans (GAGs) dan *fibrous proteins* yang tampak dalam 2 bentuk fungsional, yaitu struktural (*collagen, elastin*) dan adhesif (*fibronectin, vitronectin, laminin*)<sup>(33)</sup>.

Fibronektin menghasilkan perlekatan pada fibroblas.<sup>(33)</sup> Penurunan jenis protein ini dijumpai pada jenis tertentu sel-sel kanker, yang mungkin menjadi penyebab mengapa sel kanker tidak melekat erat satu sama lain, tapi cenderung memisah dan bermetastasis.<sup>(32)</sup> Sedangkan laminin mengasilkan perlekatan pada sel epitelial.<sup>(33)</sup>

## 2.5 Protein

Protein merupakan makromolekul yang terdiri dari satu atau beberapa polipeptida. Setiap polipeptida terdiri dari rangkaian asam amino yang saling berikatan<sup>[1,2,3]</sup>. Setiap protein memiliki fungsi khas yang dibutuhkan untuk struktur, fungsi dan regulasi dari sel-sel tubuh, jaringan dan organ<sup>[4]</sup>. Protein merupakan penyusun material sel dan dapat berperan sebagai enzim, hormon, elemen struktural dan antibodi<sup>(35)</sup>

Struktur primer protein merupakan urutan asam amino penyusun protein yang dihubungkan melalui ikatan peptide (amida). Sementara itu, struktur sekunder protein adalah struktur tiga dimensi lokal dari berbagai rangkaian asam amino pada protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen<sup>(36)</sup>

Gabungan dari aneka ragam dari struktur sekunder akan menghasilkan struktur tiga dimensi yang dinamakan struktur tersier. Struktur tersier biasanya berupa gumpalan. Beberapa molekul protein dapat berinteraksi secara fisik tanpa ikatan kovalen membentuk oligomer yang stabil (misalnya dimer, trimer, atau kuartomer) dan membentuk struktur kuartener<sup>[6]</sup>.

*Bradford protein assay* merupakan prosedur analisis spektroskopik yang digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam cairan<sup>(37)</sup>. Penilaian tersebut berbeda-beda tergantung dari komposisi asam amino dari protein yang dinilai. Pada prosedur ini terdapat prinsip spektrofotometri, *spectrometer* digunakan untuk memproduksi sinar dengan pemilihan warna (panjang gelombang) dan *photometer* untuk menerima dan menilai intensitas cahaya. Protein yang akan diukur diletakkan ditengah-tengah alat tersebut, sinar yang ditembakkan sebagian diserap oleh protein dan sebagian diterima oleh *photometer*. Alat tersebut menghantarkan sinyal tegangan ke galvanometer. Sinyal tersebut berubah sebanding dengan perubahan jumlah sinar yang diserap yang kemudian menunjukkan angka konsentrasi dari protein yang diukur<sup>(7)</sup>. Pada metode Bradford terkandung *dye* Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blue yang dapat berikatan dengan protein dalam cairan asam yang memiliki tingkat penyerapan dari 465 nm sampai 595 nm<sup>(37)</sup>. Kelebihan *Bradford protein assay* dibandingkan metode yang lain adalah lebih cepat, langkah-langkah pencampuran lebih sedikit, tidak membutuhkan pemanasan dan memberikan respons *colorimetric* yang lebih stabil<sup>(37)</sup>.

Ekspresi protein tertentu dapat dilihat berdasarkan berat molekulnya. Penentuan berat molekul dapat menggunakan metode yang dinamakan *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). Protein yang dialirkan dalam medium gel dialiri arus listrik dengan tegangan tertentu. Protein yang bermuatan negatif (anion) akan bergerak ke bawah ke arah kutub positif. Protein dengan berat molekul lebih ringan akan bergerak lebih cepat dalam medium gel. Protein akan terlihat sebagai pita-pita gelap setelah diwarnai dengan *staining solution*<sup>(38)</sup>.

## 2.6 Kerangka Teori

