

## Eksresi P16INK4a pada Squamous Cell Carcinoma Serviks Uteri dan Cervical Intraepithelial Neoplasia 1, 2, 3

Luh Yeni Laksmi<sup>1</sup>, Moestikaningsih<sup>1</sup>, Gede Raka Widiana<sup>2</sup>, Ni Putu Sriwidayani<sup>1</sup>, Ketut Mulyadi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian/SMF Patologi Anatomi, <sup>2</sup>Bagian/SMF Ilmu Penyakit Dalam  
 Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana/RSUP. Sanglah  
 Denpasar

### ABSTRAK

#### Latar belakang

Kanker serviks uteri merupakan kanker kedua terbanyak pada wanita di dunia. Pada tahun 2008, di Bali kanker serviks uteri menempati urutan kedua terbanyak keganasan setelah kanker payudara. Kanker ini diketahui berkembang dari lesi prekanker, *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). Terdapat kesulitan diagnosis dalam menentukan derajat displasia serviks uteri dan dalam menentukan lesi yang memiliki potensi progresif. Ekspresi P16INK4a diduga berkaitan dengan derajat displasia dan karsinoma serviks uteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui ekspresi P16INK4a pada *squamous cell carcinoma* (SCC) serviks uteri dan CIN1, CIN2, CIN3.

#### Metode

Penelitian ini menggunakan metode analitik potong lintang. Jumlah sampel adalah 60 sampel yang terdiri dari 10 CIN1, 10 CIN2, 10 CIN3, dan 30 SCC. Sampel diambil dari arsip blok parafin dari laboratorium swasta di Denpasar dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP. Sanglah sejak 1 Januari 2011 sampai dengan 30 Juni 2013, kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia P16INK4a. Ekspresi P16INK4a dinilai berdasarkan skor yang didapat dari hasil perkalian dari grading dan intensitas pulasan. Hasil dianalisis dengan menggunakan uji Kruskal Wallis dengan tingkat kemaknaan  $\alpha$  pada  $p < 0,05$ .

#### Hasil

Rerata skor ekspresi P16INK4a pada keempat kelompok sampel (CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC) menunjukkan hasil yang berbeda bermakna ( $X^2 = 6,6$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Rerata skor CIN1 dan CIN2 adalah -3,2 ( $p = 0,01$ ); rerata CIN2 dan CIN3 adalah -4 ( $p = 0,003$ ). Rerata skor CIN3 dan SCC adalah -1,4 artinya tidak berbeda bermakna ( $p = 0,596$ ).

#### Kesimpulan

Ekspresi P16INK4a lebih tinggi pada SCC serviks uteri daripada CIN1, CIN2, dan CIN3.

**Kata kunci:** CIN1, CIN2, CIN3, P16INK4a, SCC, serviks uteri.

### ABSTRACT

#### Background

Cervical cancer is the second most common cancer in female in the world. In Bali, in 2008, cervical cancer is the second most common malignancy after breast cancer. This cancer has known to develop from precancerous lesions, *cervical intraepithelial neoplasia* (CIN). There is difficulty to determine grade of dysplasia of the uterine cervix and to predict whether the lesion has potency of progression. The expression of P16INK4a has correlation with degree of cervical dysplasia and carcinoma. The aim of this study is to evaluate expression of P16INK4a in squamous cell carcinoma (SCC) of cervix uteri and CIN1, CIN2, CIN3.

#### Methods

A cross sectional analytic study was performed on 60 samples that divided into 10 CIN1, 10 CIN2, 10 CIN3, and 30 SCC. Samples were taken from block paraffin archive from Private Laboratory in Denpasar and Anatomical Pathology Laboratory Sanglah Hospital, during January 1<sup>st</sup> 2011 until June 30<sup>th</sup> 2013. Immunostaining was performed to determine the expression score of P16INK4a. Expression of P16INK4a was determined by for scoring system base on staining grade and intensity. The result was analyzed by Kruskal Wallis test with level of significance  $\alpha$  at  $p < 0.05$ .

#### Results

There was significant difference of mean expression score of P16INK4a among four group (CIN1, CIN2, CIN3 and SCC) ( $X^2 = 36.6$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0.001$ ). Expression scores of P16INK4a were increased significantly by grade of dysplasia (Mean difference CIN1 and CIN2 -3.2,  $p = 0.01$ ; CIN2 and CIN3 -4,  $p = 0.003$ ). Mean score CIN3 and SCC was not different significantly (mean difference -1.4,  $p = 0.596$ ).

#### Conclusion

Expression of P16INK4a is higher on SCC uterine cervix is higher than CIN1, CIN2, and CIN3.

**Key words:** CIN1, CIN2, CIN3, P16INK4a, SCC, uterine cervix.

**PENDAHULUAN**

Kanker serviks masih menjadi penyebab kesakitan dan kematian utama di seluruh dunia dan merupakan kanker ke-2 terbanyak yang terjadi pada wanita.<sup>1,2</sup> Keganasan ini memiliki insiden yang tinggi, diperkirakan terdapat 500.000 kasus baru tiap tahun dan sekitar 350 pasien meninggal oleh karena penyakit ini,<sup>2</sup> dan lebih dari 190.000 wanita ini berasal dari negara yang sedang berkembang seperti di Amerika Selatan, *sub-Saharan Africa* dan *Far East*.<sup>3,4</sup> Berdasarkan data registrasi kanker berbasis patologi pada tahun 2008, di Bali terdapat 270 kasus kanker serviks yang menempati peringkat ke-2 terbanyak setelah kanker payudara.<sup>5</sup>

Faktor penyebab utama kanker serviks adalah infeksi *human papillomavirus* (HPV) yang ditularkan melalui hubungan seksual.<sup>3,6,7</sup> Infeksi HPV dideteksi pada seluruh lesi preneoplastik (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN) maupun neoplastik pada serviks uteri.<sup>3</sup>

*Human papillomavirus* berkontribusi dalam perkembangan lesi neoplastik melalui onkoprotein virus yang disebut dengan E6 dan E7.<sup>8</sup> Inaktivasi pRB oleh protein E7 dari HPV dapat menyebabkan *upregulation* P16INK4a pada lesi servikal.<sup>9</sup> Ekspresi P16INK4a tersebut mencetuskan kontrol *feedback* negatif terhadap pRB sehingga meningkatkan kadar P16INK4a yang biasanya akan menghambat fosforilasi pRB dan memblokir pelepasan *elongation 2 factor* (E2F).<sup>9,10</sup> Protein P16INK4a ini tidak dapat menetralkan pelepasan E2F yang diperantarai oleh E7 dari HPV, sehingga terdapat akumulasi yang berlebihan dari protein P16INK4a yang tidak efektif pada sel. Gangguan pengaturan jalur siklus sel pRB-P16INK4a menghasilkan proliferasi sel yang tidak terbatas yang pada akhirnya berkontribusi terhadap transformasi sel ke arah keganasan.<sup>9</sup> Analisis imunohistokimia ekspresi p16INK4a sangat berguna, karena ekspresinya berhubungan dengan derajat displasia histologi, yang menunjukkan bahwa P16INK4a mungkin memiliki nilai prognostik dan prediktif dalam penatalaksanaan neoplasia serviks uteri.<sup>11</sup>

Beberapa literatur menyebutkan bahwa lesi displastik sebagian akan mengalami regresi sebagian akan progresif dan berkembang menjadi kanker tergantung dari derajat displasia, respon imun masing-masing individu dan tipe HPV yang menginfeksi. Hanya 1% lesi CIN1 dan 5% lesi CIN2 tetapi lebih dari 12% lesi CIN3

yang akan progresif menjadi kanker serviks yang invasif. Jadi ketepatan diagnosis dalam menentukan derajat CIN/derajat displasia akan mempengaruhi penanganan dan prognosis pasien.<sup>12,13</sup>

Dalam praktek sehari-hari, di Laboratorium Patologi Anatomi RSU Sanglah, Denpasar pada kasus-kasus karsinoma serviks uteri terdapat berbagai tingkatan lesi pre-kursor/pre-malignan yaitu CIN1, CIN2, CIN3 yang menyertai lesi invasif. Sementara pada sampling biopsi hanya sebagian kecil lesi yang terambil, berupa jaringan kecil yang sudah terfragmentasi, bahkan hanya epitel permukaannya saja tanpa stroma jaringan ikat subepitel sehingga belum tentu mendapatkan bagian jaringan yang mengalami perubahan morfologi yang berat yang menunjukkan gambaran displasia maupun proses invasif serta sulit menentukan apakah lesi tersebut progresif atau regresif dengan hanya pewarnaan H&E saja. Menurut Kalof dan Cooper, penatalaksanaan lesi CIN walaupun tergantung dari banyak faktor termasuk usia pasien, paritas, dan ukuran lesi, tetapi konfirmasi CIN dari pemeriksaan histopatologi juga sangat menentukan tindakan selanjutnya bagi klinisi.<sup>14</sup>

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi P16INK4a pada CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC, serta membuktikan bahwa ekspresi P16INK4a lebih tinggi pada SCC daripada CIN1, CIN2, CIN3.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian dengan menggunakan metode analitik observasional potong lintang. Penelitian dilakukan di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/RSUP. Sanglah, Denpasar dan di Bagian/SMF Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada/RSUP Dr. Sardjito, Yogyakarta sejak 25 Maret-15 Juli 2013. Jumlah sampel adalah sebesar 60 sampel yang terdiri atas 10 sampel CIN1, 10 sampel CIN2, 10 sampel CIN3, dan 30 sampel SCC serviks uteri. Sampel diambil dari arsip blok parafin dari Laboratorium Swasta dan Laboratorium Patologi Anatomi RSUP Sanglah, Denpasar sejak 1 Januari 2011 sampai dengan 30 Juni 2013. Dilakukan re-evaluasi mikroskopik dengan pulasan H&E, kemudian dilakukan pulasan imunohistokimia menggunakan *anti-*

body rabbit monoclonal (EPR1473) to CDKN2A/P16INK4a dari Abcam.

Interpretasi pulasan imunohistokimia dinilai secara semikuantitatif, diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya binokuler Olympus CX21 pada satu lapang pandang dengan pembesaran dari 40 kali sampai 400 kali. Penilaian ekspresi P16INK4a dibuat dengan mengevaluasi dua parameter yaitu persentase sel-sel yang tercat positif dengan P16INK4a dan intensitasnya. Persentase dari sel-sel yang tercat positif di-*grading* sebagai berikut: *grade* 0: bila tidak ada sel yang tercat, *grade* 1: bila > 0-10% sel yang tercat, *grade* 2 : bila > 10-50% sel yang tercat, *grade* 3: bila >50-80% sel yang tercat, *grade* 4: bila >80% sel yang tercat. Reaksi intensitasnya diskor sebagai berikut: 0: bila negatif, 1: bila intensitas warna lemah, 2: bila intensitas warna sedang, 3: bila intensitas warna kuat.<sup>15</sup> Kemudian dibuat skor ekspresi imunohistokimia P16INK4a dengan mengalikan *grading* dan skor intensitas. Nilai skor ekspresi dari 0 sampai 12.

Perbedaan ekspresi P16INK4a antara CIN1, CIN2, CIN3 dan SCC serviks uteridiuji dengan analisis bivariate Kruskal Wallis. Tingkat kemaknaan ( $\alpha$ ) pada  $p < 0,05$ . Presisi data ditentukan dengan nilai IK 95%.

**HASIL**

Rentang umur pasien pada penelitian ini cukup bervariasi yaitu dari usia 24 tahun sampai 72 tahun dengan jumlah terbanyak pada rentang usia 40-49 tahun (Gambar 1). Rerata distribusi umur terbanyak berturut-turut pada kasus CIN1, CIN2, CIN3, dan SCC serviks uteri yaitu dekade 4, 5, 5, 6 (Tabel 1).

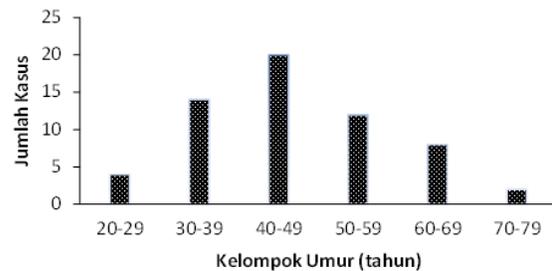
Total sampel penelitian ini adalah 60 sampel yang terdiri dari 10 sampel CIN1 (16,7%), 10 sampel CIN2 (16,7%), 10 sampel CIN3 (16,7%), dan 30 sampel SCC serviks uteri (50%) (Tabel 1). Sedangkan pada pemeriksaan *grade* ekspresi P16INK4a didapatkan sebagai berikut: *grade* (0) 1 kasus (1,7%), *grade* (1) 4 kasus (6,7%), *grade* (2) 12 kasus (20%), *grade* (3) 13 kasus (21,7%) dan *grade* (4) 30 kasus (50%) (Tabel 1). Pemeriksaan intensitas ekspresi P16INK4a dari 60 sampel menunjukkan berturut-turut 1(1,7%) negatif (tidak terpulas), 13 (21,7%) terpulas dengan intensitas lemah, 17 (28,3%) terpulas dengan intensitas sedang, 29 (40,3%) terpulas dengan intensitas kuat (Tabel 2).

Tabel 1. Distribusi rerata umur kelompok CIN1, CIN2, CIN3, dan SCC serviks uteri.

Kelompok	Rerata umur $\pm$ SD
CIN1	37,7 $\pm$ 4,67
CIN2	45,7 $\pm$ 10,83
CIN3	43,1 $\pm$ 7,09
SCC	50,03 $\pm$ 13,2
Total	46,0 $\pm$ 12,0

Tabel 2. Karakteristik subyek penelitian.

Karakteristik	Jumlah
Diagnosis:	
CIN1	10 (16,7%)
CIN2	10 (16,7%)
CIN3	10 (16,7%)
SCC serviks uteri	30 (50,0%)
Grade	
(0) 0%	1 (1,7%)
(1) >0-10%	4 (6,7%)
(2) >10-50%	12 (20%)
(3) >50-80%	13 (21,7%)
(4) >80%	30 (50,0%)
Intensitas	
(0) Negatif	1 (1,7%)
(1) Lemah	13 (21,7%)
(2) Sedang	17 (28,3%)
(3) Kuat	29 (40,3%)



Gambar 1. Grafik distribusi kasus berdasarkan kelompok umur.

Tabel 3. Rerata skor ekspresi P16INK4a antara kelompok CIN1, CIN2, CIN3, dan SCC serviks uteri.

Kelompok	Rerata $\pm$ SD	CI beda rerata	p
CIN1	1,6 $\pm$ 0,8 [CI-1,3-(-5,0)]	-5,0 sd -1,3	0,001
CIN2	4,8 $\pm$ 1,6 [CI-1,2-(-6,8)]	-6,8 sd -1,2	0,003
CIN3	8,8 $\pm$ 2,4 [CI-1,3-(-4,2)]	-4,2 sd 1,3	0,596
SCC	10,2 $\pm$ 3,0		

Uji *one way anova* antar kelompok  $F=36,38$ ;  $df=3$ ;  $p < 0,001$ .  
 Uji Kruskal Wallis antar kelompok  $Chi=36,65$   $df=3$ ;  $p < 0,001$ .

Tabel 3 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan rerata skor ekspresi P16INK4a yang semakin meningkat dari CIN1, CIN2, CIN3 sampai SCC serviks uteri berturut-turut 1,6 $\pm$ 0,8 vs 4,8 $\pm$ 1,6 vs 8,8 $\pm$ 2,4 vs 10,2 $\pm$ 3,0; dan beda rerata antara CIN1 dengan CIN2 -3,2; CIN2 dengan CIN3 -4,0; CIN3 dengan SCC serviks uteri -1,4. Antara CIN1 dengan CIN2 berbeda secara bermakna di mana nilai  $p=0,001$

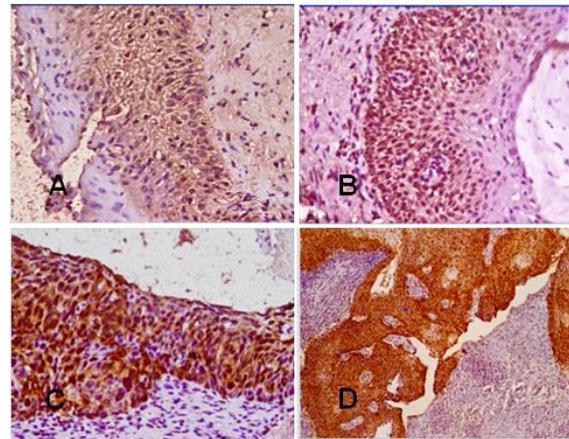
( $p < 0,05$ ). Antara CIN2 dengan CIN3 berbeda secara bermakna dimana nilai  $p = 0,003$  ( $p < 0,05$ ). Antara CIN3 dengan SCC serviks uteri tidak berbeda secara bermakna dimana nilai  $P = 0,596$  ( $p > 0,05$ ). Dengan uji Kruskal Wallis didapatkan bahwa nilai  $X^2 = 36,65$ ;  $df = 3$  dengan nilai  $p < 0,001$ . Ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata skor ekspresi P16INK4a yang bermakna di antara ke empat kelompok tersebut.

**DISKUSI**

Pada Tabel 1, terlihat bahwa rerata umur pasien adalah  $46 \pm 12$  tahun, dengan rentang umur yang bervariasi yaitu sejak usia 24 tahun sampai 72 tahun dan jumlah terbanyak pada rentang umur 40-49 tahun. Pada kasus CIN1, umur penderita terbanyak terjadi pada dekade 4, sedangkan pada CIN2 dan CIN3, umur penderita terbanyak terjadi pada dekade 5. Sedangkan pada kasus SCC serviks uteri terbanyak I terjadi pada dekade 6, diikuti pada dekade 7. Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa kasus-kasus CIN1, CIN2, CIN3 terjadi pada usia yang lebih tua dibandingkan dengan data dari *Kaiser Northern California*, di mana CIN1 terjadi pada usia 15 dan 19 tahun, sedangkan CIN2 dan CIN3 terjadi pada usia di bawah 25-29 tahun.<sup>13</sup> Diduga perbedaan ini karena di dunia barat perilaku budaya *free sex* sudah dimulai sejak usia dini, sedangkan di dunia timur perilaku *free sex* di kalangan remaja masih ditabukan dan masih adanya budaya bahwa hubungan seks hanya boleh dilakukan bila seseorang telah menikah.<sup>13</sup> Namun, umur pasien pada kasus SCC serviks uteri terlihat mirip dengan umur pasien kanker serviks invasif yang dilaporkan. *Survellance Epidemiology and End Results*, (SEER) yang menyatakan bahwa kejadian kanker serviks meningkat pada usia 40 tahun sampai 65 tahun dan sedikit menurun di atas usia 65 tahun.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini kami memeriksa 60 sampel yang terdiri atas 10 sampel CIN1, 10 sampel CIN2, 10 sampel CIN3, dan 30 sampel SCC serviks uteri. Setelah dilakukan pemeriksaan immunohistokimia dengan P16INK4a dan uji statistik didapatkan bahwa terdapat perbedaan rerata skor ekspresi P16INK4a yang bermakna pada empat kelompok tersebut (CIN1, CIN2, CIN3, dan SCC serviks uteri), di mana nilai  $p < 0,001$ . Dari data diketahui bahwa terjadi peningkatan rerata skor ekspresi P16INK4a dari CIN1 ke CIN2, dari CIN2 ke CIN3, dan dari CIN3

ke SCC serviks uteri, walaupun antara CIN3 dan SCC tidak berbeda bermakna.



Gambar 2. A. Ekspresi P16INK4a pada CIN1, skor 3; B. Ekspresi P16INK4a pada CIN2, skor 6; C. Ekspresi P16INK4a pada CIN3, skor 12; D. Ekspresi P16INK4a pada SCC serviks uteri, dengan skor.

Hasil tersebut didukung oleh penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa meningkatnya intensitas P16INK4a berhubungan dengan meningkatnya derajat CIN.<sup>16</sup> Secara statistik terdapat perbedaan bermakna ekspresi P16INK4a antara lesi serviks uteri (CIN) dan *grade* CIN.<sup>7,17,18</sup> Penelitian lain menyatakan bahwa peningkatan skor ekspresi P16INK4a sejalan dengan peningkatan *grade* dari CIN, atau dengan kata lain ekspresi P16INK4a berkaitan dengan *grade* CIN yang mengesankan bahwa P16INK4a mungkin memiliki nilai prognostik dan prediktif dalam penatalaksanaan neoplasia serviks uteri.<sup>11</sup> Ekspresi P16INK4a berkorelasi baik dengan meningkatnya *grade* dari CIN, artinya terdapat hubungan linier antara meningkatnya *grade* CIN dan ekspresi P16INK4a.<sup>19-21</sup> Namun, penelitian terakhir menyatakan bahwa ekspresi P16INK4a lebih tinggi secara signifikan pada CIN2 dan CIN3 dibandingkan dengan CIN1.<sup>20,22</sup> Persamaan hasil penelitian ini dengan penelitian yang lain diduga disebabkan oleh teori proses karsinogenesis karsinoma serviks uteri, yang sebagian besar berkaitan dengan infeksi persisten dengan *high-risk* HPV (hr-HPV), dan tipe hr-HPV manapun memiliki protein onkogen dengan kekuatan yang sama dalam menimbulkan perubahan lesi pre-malignan sampai malignansi pada epitel serviks dan tidak bergantung pada

ras dari wanita yang terinfeksi, sehingga perubahan-perubahan morfologi yang bisa dilihat secara histopatologi dengan pewarnaan H&E maupun ekspresi protein molekular yang bisa diidentifikasi seperti P16INK4a dengan pulasan imunohistokimia adalah sama. Faktor risiko lain yang berkaitan dengan terjadinya malignansi pada serviks uteri adalah merokok, jumlah pasangan seksual yang banyak, melakukan hubungan seksual pada usia dini (kurang dari 16 tahun), penyakit menular seksual yang lain seperti *Herpes simplex virus*, *Chlamydia Trachomatis*, kehamilan pada usia muda, paritas yang tinggi, sosial ekonomi yang rendah, *Human Immunodeficiency Virus*, keadaan immunosupresi dengan penyebab apapun, defisiensi vitamin, dan kontrasepsi oral yang digunakan; faktor risiko tersebut pada penelitian ini tidak diteliti. Sebagian dari faktor risiko tersebut belum diketahui dengan jelas perannya dalam patogenesis kanker serviks, sebagian masih kontroversi.<sup>13</sup>

Pada penelitian ini ditemukan peningkatan rerata skor ekspresi P16INK4a dari CIN1 ke CIN2, dari CIN2 ke CIN3, dan dari CIN3 ke SCC serviks uteri. Hal ini diduga berkaitan dengan siklus infeksius *papillomavirus* dan perubahan-perubahan morfologi maupun molekular yang ditimbulkan oleh hr-HPV tersebut. Sebagian besar lesi CIN1 mempertahankan virus sebagai episom, yang mendukung siklus replikasi virus yang komplit dan gen virus terekspresi, khususnya E6 dan E7 yang diatur secara ketat. *Late genes*-pun terekspresi, partikel virus terkumpul dan terlepas.<sup>23,24</sup> Pada lesi CIN1 ini berarti ekspresi protein E6 dan E7 masih relatif sedikit karena diatur secara ketat tidak berlebihan, sehingga pRB yang terikatpun lebih sedikit dan efek dari pengikatan tersebut berpengaruh terhadap diaktifkannya protein penghambat siklus sel yaitu P16INK4a dihasilkan juga relatif sedikit sesuai kebutuhan. Pada CIN1 atipia inti terjadi pada sepertiga ketebalan epitel, sehingga P16INK4a juga terekspresi pada sepertiga ketebalan epitel namun dengan *grade* dan intensitas yang lemah.<sup>3,23,24</sup>

Lesi CIN2 dan CIN3 berhubungan secara eksklusif dengan tipe hr-HPV. Pada umumnya karena defek pada diferensiasi selular yang menandai lesi-lesi ini, *high grade* CIN tidak menyokong siklus infeksius virus yang komplit. Ekspresi *Late gene* berkurang dan hilang secara signifikan, urutan DNA virus mungkin berinte-

grasi ke dalam *genome host*, dan ekspresi onkogen E6 dan E7 ditata ulang dan diproduksi secara berlebihan.<sup>23,24</sup> Hal ini berkaitan dengan pengikatan pRB dengan E7 yang berdampak terhadap aktivasi protein inhibitor siklus sel yaitu P16INK4a yang juga diproduksi semakin banyak dengan semakin banyaknya sel epitel yang terinfeksi disertai dengan integrasi DNA virus ke *genome host*, sehingga pada CIN2, hanya 2/3 sel-sel epitel yang mengalami displasia/atipia inti, maka P16INK4a juga terekspresi pada 2/3 ketebalan epitel sehingga skor ekspresinya pun meningkat dibandingkan dengan CIN1.<sup>23,24</sup>

Protein P16INK4a pada CIN3 yang diproduksi semakin dapat dideteksi pada seluruh ketebalan epitel dengan intensitas kuat, sehingga menghasilkan skor yang lebih tinggi dibandingkan dengan CIN1 maupun CIN2. Pada CIN3 seluruh ketebalan epitel dipenuhi oleh sel-sel yang proliferasif di mana maturasi sitoplasmik minimal. Perubahan morfologi sel ditandai dengan abnormalitas nuklear seperti pleomorfik dan hiperkromatik serta mitosis abnormal banyak ditemukan.<sup>3,23</sup> Semakin banyak sel yang terinfeksi hr-HPV dengan integrasi DNA virus ke *genome host* (DNA *host*) merupakan bagian yang kritis dalam perkembangan karsinogenesis serviks, melalui gangguan terhadap *open reading frame* E1/E2 dari genom HPV dan selanjutnya E2 kehilangan kemampuannya untuk mengontrol pengaturan ekspresi *oncogen* E6 dan E7 sehingga produksi E6 dan E7 yang berlebihan, menginaktifkan protein P53 dan pRb dari *host*, menghasilkan proliferasi sel tak terkendali dan *cellular immortalisation*, yang memungkinkan untuk transformasi ke CIN3 dengan potensi menjadi progresif ke arah karsinoma invasif.<sup>14</sup> P16INK4a akan menghambat ikatan antara cyclin D dengan CDK4 yang selanjutnya akan menghambat fosforilasi Rb. Pada keadaan adanya infeksi HPV, ikatan E7 dengan pRb akan meningkatkan produksi P16INK4a.<sup>9,25</sup>

Skor ekspresi P16INK4a lebih tinggi pada SCC mungkin juga disebabkan karena pada SCC sudah lebih banyak terjadi ketidakstabilan genetik serta *aneuploidy* kromosom seperti yang ditulis oleh Stanley (2010) bahwa CIN dan SCC ditandai dengan atipia sitologik dan histologik yang lebih berat yang mencerminkan *aneuploidy* kromosom dan ketidakstabilan genetik. Lesi yang secara genetik tidak stabil mampu berkembang dan progresif oleh karena

meningkatnya kemungkinan terjadinya mutasi lebih lanjut pada gen *host* yang menyebabkan karsinoma.<sup>23</sup> Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan bermakna rerata skor ekspresi P16INK4a antara CIN3 dengan SCC serviks uteri, pada  $p = 0,596$  ( $p > 0,05$ ). Hasil ini sesuai dengan penelitian yang terdahulu yang menunjukkan bahwa perbedaan ekspresi P16INK4a antara CIN3 dan SCC secara statistik tidak signifikan.<sup>25,26</sup> Peneliti lain menyatakan bahwa hampir 100% lesi CIN3 dan SCC menunjukkan level yang tinggi dari ekspresi P16INK4a.<sup>17</sup> Hal ini diduga disebabkan karena pada lesi CIN3 dan SCC merupakan hasil progresivitas lesi CIN1 dan CIN2 di mana pada saat progresi lesi menjadi yang lebih parah melibatkan banyak faktor karena infeksi HPV yang menyebabkan jumlah kromosom abnormal, ketidakstabilan genetik, mutasi dan perubahan genetik selular, penataan ulang ekspresi gen viral (terutama onkogen E6 dan E7), juga faktor *host* tersebut sendiri dan lingkungan.<sup>23</sup> Ekspresi P16INK4a antara CIN3 dan SCC serviks uteri tidak berbeda bermakna, diduga disebabkan karena pada CIN3 dan SCC serviks uteri terjadi produksi onkoprotein E7 yang berlebihan serta faktor lain yang terkait dengan perubahan molekuler selular lainnya, yang berhubungan dengan karsinogenesis karsinoma serviks uteri.<sup>23</sup>

Eksresi P16INK4a antara CIN3 dan SCC serviks uteri tidak menunjukkan hasil yang berbeda bermakna, diduga karena masalah teknis seperti: (1) subjektivitas peneliti dalam menginterpretasikan hasil pulasan P16INK4a; (2) besar sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang banyak; (3) *antibody clone* yang digunakan berbeda dengan peneliti lain (peneliti menggunakan *rabbit monoclonal* (EPR1473) to CDKN2A/p16INK4a); (4) standar kriteria yang digunakan dalam penilaian skoring imunoekspresi P16INK4a berbeda-beda pada tiap peneliti, belum ada standar bagaimana menginterpretasikan pulasan imunohistokimia P16INK4a.<sup>23,24</sup>

Pada penelitian ini menunjukkan adanya 1 kasus dengan skor 0. Hal ini diduga karena salah interpretasi biopsi serviks yang normal sebagai CIN1, karena: (1) penilaian histologi CIN sangat rumit; misalnya membedakan antara kondisi normal dan CIN dari berbagai *grade*.<sup>16,27,28</sup> (2) CIN1 yang diinduksi oleh infeksi *low risk* HPV (I<sub>r</sub>-HPV). Lesi serviks *low grade*

(CIN1) dapat disebabkan oleh infeksi I<sub>r</sub>-HPV dan hr-HPV dan secara histopatologik sulit dibedakan. Namun, dengan pemeriksaan imunohistokimia P16INK4a CIN1 yang diinduksi oleh infeksi I<sub>r</sub>-HPV dapat menunjukkan ekspresi P16INK4a yang negatif. Jika CIN1 memiliki skor ekspresi yang lebih tinggi maka kasus tersebut diduga diinfeksi oleh hr-HPV dan kecenderungan berkembang menjadi lesi *high grade*.<sup>8,29</sup> Pulasan imunohistokimia P16INK4a terbukti berguna pada kasus-kasus CIN1 yang mengandung I<sub>r</sub>-HPV atau hr-HPV, sehingga dapat memperkirakan progresivitas lesi servikal menjadi CIN2, CIN3, sampai kanker atau regresi.<sup>8,30</sup>

Penelitian lain menyatakan bahwa hubungan ekspresi P16INK4a antara gambaran histopatologik dan *viral load* tipe hr-HPV pada lesi neoplastik servikal, mengalami proses regresif.<sup>10</sup> Sedang peneliti lain menyatakan bahwa P16INK4a sangat berguna dalam membedakan antara lesi epitel normal dan lesi *high grade*, juga memperkirakan lesi *low grade* dengan ekspresi P16INK4a yang tinggi mengesankan meningkatnya risiko kanker karena bersatunya genomik dari onkogenik HPV.<sup>15</sup> Namun, belum ada cara yang dapat dipercaya untuk memprediksi lesi CIN yang akan berkembang menjadi kanker invasif, atau tetap stabil atau regresi menjadi normal.<sup>10</sup>

Peneliti sebelumnya menyatakan bahwa lesi CIN1 tidak mengekspresikan P16INK4a. Hal ini dibuktikan oleh penelitian terdahulu yang menggunakan teknik *polymerase chain reaction*-nya (PCR), yaitu bahwa ekspresi P16INK4a negatif pada CIN dan karsinoma tetap ada walaupun hasil pemeriksaan PCR positif mengandung hr-HPV.

## KESIMPULAN

Eksresi P16INK4a pada SCC serviks uteri lebih tinggi dari pada CIN1, CIN2, CIN3.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, *et al.* Protein p16INK4a as a marker of dysplastic and neoplastic alteration in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. 2004; 4: 1-10.
2. Skiba D, Mehlhorn G, Fasching PA, Beckmann MW, Ackermann S. Prognostic significance of serum antibodies to HPV-16 L1 virus like particles in patients with

- invasive cervical cancer. *Anticancer Res.* 2006; 26: 4921-6.
3. Wells M, Ostor AG, Crum CP, Franceschi S, Tommasino M. Epithelial tumours. In: Tavassoli FA, Devilee P, Editors. WHO: Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organ. Lyon: IARC Press; 2003.
  4. Hwang SJ, Shroyer KR. Biomarker of cervical dysplasia and carcinoma. *J Oncol.* 2012; 1-9.
  5. Susanti I. Registrasi Kanker di Denpasar. Dalam: Kanker di Indonesia Tahun 2008 Data Histopatologi. Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI, Badan Registrasi Kanker Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Indonesia. Jakarta: Yayasan Kanker Indonesia; 2008.
  6. Tjalma WAA, van Waes TR, van Den ELEM, Bogers JJPM. Role of human papillomavirus in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma and adeno-carcinoma of the cervix. *J Best Pract Res Clin Obst Gynecol.* 2005; 19: 469-83.
  7. Nam EJ, Kim JW, Hong JW, Jang HS, Lee SY, Jang SY, *et al.* Expression of the p16INK4a and Ki-67 in relation to the grade of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infection. *J Gynecol Oncol.* 2008; 19: 162-8.
  8. Jedpiyawongse A, Homcha-em P, Karalak A, Srivatanakul P. Immunohistochemical overexpression of p16INK4a protein associated with cervical cancer in Thailand. *As Pac J Cancer Prev.* 2008; 9: 625-30.
  9. Khan A, Singer A. Biomarkers in cervical precancer management: the new frontiers. *Fut Oncol.* 2008; 4: 515-425.
  10. Andersson S, Wangsa D, Flores-Staino C, Safari H, Mints M, Hjerpe A. Expression of p16INK4a in relation to histopathology and viral load of 'high risk' HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 2815-20.
  11. Lesnikova I, Lidang M, Dutoit SH, Koch J. P16 as a diagnostic marker of cervical neoplasia: a tissue microarray study of 796 archival specimens. *Diagn Pathol.* 2009; 4: 1-7.
  12. Wright TC. Pathology of HPV infection at cytology and histologic level: basis for a 2-tiered morphologic classification system. *Int J Gynecol Oncol Obst.* 2006; 94: S22-31.
  13. Wright TC, Ronnett BM, Kurman RJ, Ferenczy A. Precancerous lesions of the cervix. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, Editors. *Blaustein's Pathology of The Female Genital Tract.* 6<sup>th</sup> ed. New York: Springer; 2011.
  14. Kalof AN, Cooper K. Our approach to squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 2007; 60: 449-55.
  15. Izadi-Mood N, Asadi K, Shojaei H, Sarmadi S, Ahmadi SA, Sani S, *et al.* Potential diagnostic value of p16INK4a expression in premalignant and malignant cervical lesion. *J Res Med Sci.* 2012; 17: 428-33.
  16. Galgano M, Castle P, Atkins K, Brix W, Nassau S, Stoler M. Using biomarkers as objective standars in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol.* 2010; 34: 1077-87.
  17. Karcheva M, Popovska S, Nachev R. Immunohistochemical investigation of P16INK4a expression in carcinomas and high grade cervical lesions. *J IMAB Ann Proc.* 2007; 1: 22-4.
  18. Wu H, Shi H, Kong L. Relationship of HPV L1 and P16 expression with different cervical lesions. *SRE.* 2011; 69: 3724-8.
  19. Tan GC, Norlatifah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, *et al.* Immunohistochemical study of p16INK4a and survivin expressions in cervical squamous neoplasm. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010; 53: 1-6.
  20. Haltas H, Bayrak R, Yenidunya S, Yildirim U. The immunohistochemical detection of P16INK4a and capsid protein on cell block sections from residual papspin liquid based gynecology cytology specimen as a diagnostic and prognostic tool. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16: 1588-95.
  21. Murphy N, Ring M, Heffron CCBB, King B, Kilalea AG, Hughes C, *et al.* P16INK4a, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2012; 58: 525-34.
  22. Dordevic B, Zivkovic N. Evaluation of p16INK4a protein as biomarker for cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Acta Med Median.* 2011; 50: 29-33.

23. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol.* 2010; 117:S5-10.
24. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 2006; 110: 525-41.
25. Wang J, Zheng B, Nokelainen K, Angstrom T, Lindstrom M, Wallin K. P16INK4a and p14ARF expression pattern by immunohistochemistry in human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Modern Pathol.* 2005; 18: 629-37.
26. Cheah P-L, Looi L-M, Teoh K-H, Mun K-S, Nazarina AR. P16INK4a is a useful marker human papillomavirus integration allowing risk stratification for cervical malignancies. *As Pac J Cancer Prev.* 2012; 13: 469-72.
27. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, *et al.* P16INK4a immunohistochemistry improves inter-observer agreement in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 2: 1389-98.
28. Horn L-C, Reichert A, Oster A, Arndal SF, Trunk MJ, Ridder R, *et al.* Immunostaining for p16INK4a used as conjunctive tool improves interobserver agreement of the histologic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32: 502-12.
29. Mocuta D, Craiut D, Pop T, Lazar E. The possible role of P16, E-caderin and BCL-2 expression in prognosis of cervical precancerous lesions. *J Exp Med Surg Res.* 2010; 3: 200-4.
30. Bolanca IK, Sentija K, Simon SK, Kukura V. Estimating clinical outcome of HPV induced cervical lesions by combination of capsid protein L1 and P16INK4a protein detection. *Coll Antropol.* 2010; 34: 31-6.