

Laporan Penelitian**Hubungan mutasi gen *ras* dan *p53* pada penderita karsinoma nasofaring dengan riwayat merokok****Mohammad Dwijo Murdiyo, Cici Sunihapsari, Pudji Rahaju,
Endang Retnoningsih, Johannes Bambang Soemantri**Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala Leher
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya/RSUD dr.Saiful Anwar
Malang**ABSTRAK**

Latar belakang: Karsinoma nasofaring (KNF) memiliki etiologi multifaktorial yaitu infeksi virus *Epstein Barr*, faktor genetik dan faktor lingkungan. Asap rokok adalah salah satu faktor lingkungan yang mengandung bahan karsinogen. Onkogen *ras* dan *tumor suppressor gen p53* memiliki peran pada karsinogenesis. Mutasi gen-gen tersebut dianggap berperan pada karsinogenesis KNF. **Tujuan:** Untuk mengetahui hubungan mutasi gen *ras* dan *p53* pada penderita KNF dengan riwayat merokok. **Metode:** Studi *cross sectional* dengan subjek penelitian 30 penderita KNF WHO tipe III stadium lanjut. Pemeriksaan mutasi gen *ras* dan *p53* melalui pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR) dan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Analisa statistik menggunakan uji *Fisher's exact* dan uji T. **Hasil:** Mutasi *N-ras* didapatkan pada 21(75%) subjek dari 28 subjek yang dapat diketahui mutasinya. Satu (3,33%) subjek mengalami mutasi *H-ras* dari 30 subjek. Tidak didapatkan hubungan bermakna antara mutasi *N-ras* ($p=0.662$) dan *H-ras* ($p=0.400$) dengan riwayat merokok. Tidak ada perbedaan bermakna rata-rata jumlah, lamanya dan paparan kumulatif rokok antara subjek yang mengalami mutasi atau tidak mutasi *N-ras* dan *H-ras* ($p>0.05$). Mutasi *p53* didapatkan pada 27 (93.15%) subjek dari 29 subjek. Tidak ada hubungan bermakna antara riwayat merokok dengan terjadinya mutasi *p53* ($p=1.000$). Tidak ada perbedaan bermakna rata-rata jumlah, lamanya dan paparan kumulatif rokok antara subjek yang mengalami mutasi atau tidak ada mutasi *p53* ($p>0.05$). **Kesimpulan:** Tidak didapatkan hubungan bermakna antara riwayat merokok dengan terjadinya mutasi *N-ras*, *H-ras* dan *p53*. Tidak ada perbedaan bermakna rata-rata jumlah, lamanya dan paparan kumulatif rokok antara subjek yang mengalami dan yang tidak mengalami mutasi *N-ras*, *H-ras* dan *p53*.

Kata kunci: karsinoma nasofaring, *ras*, *p53*, merokok.

ABSTRACT

Background: *Nasopharyngeal carcinoma (NPC)* is a malignancy with multifactorial etiology involving *Epstein Barr virus infection*, genetic and environmental factors. Cigarette smoking is one of the environmental factors which have many compounds of carcinogen. *Oncogene ras* and *tumor suppressor p53 gene* play an important role in carcinogenesis. Mutation of these genes may contribute to NPC carcinogenesis. **Purpose:** To determine correlation between *ras* and *p53* mutations in NPC patients with cigarette smoking history (quantity, duration, cumulative exposure). **Methods:** Thirty patients diagnosed as end stage type III WHO NPC were included in this cross sectional study. Thirty NPC biopsies were assessed for *ras* and *p53* mutation by *polymerase chain reaction (PCR)* and *restriction fragment length polymorphism (RFLP)*. The *Fisher's exact test* and *T test* were used to analyse the correlation of *ras*, *p53* mutation and cigarette smoking history. **Results:** *N-ras* mutation was observed in 21(75%) subjects. One (3,33%) subject had *H-ras* mutation. There were no significant correlation between cigarette smoking history with *N-ras* ($p=0,662$) and *H-ras* ($p=0,400$) mutation, no significant correlation between *N-ras*, *H-ras* mutation with quantity, duration and cumulative exposure of cigarette smoking ($p>0.05$). The *p53* mutation was observed in 27 (93.1%). No significant correlation between cigarette smoking history and *p53* mutation ($p=1.000$). No significant correlation between *p53* mutation with quantity, duration and cumulative exposure of cigarette smoking ($p>0.05$). **Conclusion:** There were no significant correlation between cigarette smoking history and mutation of *N-ras*, *H-ras* and *p53*. *N-ras*, *H-ras*, *p53* mutations were not correlated with quantity, duration and cumulative exposure of cigarette smoking.

Keywords: *nasopharyngeal carcinoma*, *ras*, *p53*, cigarette smoking.

Alamat korespondensi: Mohammad Dwijo Murdiyo-FKUB/RSUD dr.Saiful Anwar Malang, e-mail: mamaddwi@yahoo.com

PENDAHULUAN

Karsinoma nasofaring merupakan keganasan yang jarang ditemui di sebagian dunia.¹ KNF merupakan tumor ganas yang paling banyak dijumpai di antara tumor ganas THT di Indonesia, di mana KNF termasuk dalam 5 besar tumor ganas dengan frekuensi tertinggi. KNF di daerah kepala dan leher menduduki tempat pertama.² Data dari Bagian THT Dr. Soetomo Surabaya pada tahun 2000-2001 didapatkan kasus baru sebanyak 623 orang, perbandingan laki-laki dan perempuan sebesar 2:1 dengan kelompok umur terbanyak pada dekade ke-5.³ Data pencatatan medik RSUD Dr. Saiful Anwar Malang didapatkan kasus baru KNF sebesar 46 penderita pada tahun 2008, 37 penderita pada tahun 2009, 40 penderita pada tahun 2010.⁴

Karsinoma nasofaring merupakan keganasan yang berhubungan dengan ras/suku, variasi geografi, dan memiliki faktor penyebab yang multifaktorial yang melibatkan peranan lingkungan, virus, dan genetik. Salah satu faktor lingkungan yang berperan terhadap terjadinya KNF yaitu merokok. Pada penelitian di Amerika, dua pertiga penderita KNF tipe I dipengaruhi oleh rokok, tetapi risiko pada KNF tipe II atau tipe III tidak berhubungan dengan merokok.⁵ Penelitian yang dilakukan pada beberapa negara seperti Thailand dengan KNF WHO tipe III yang dominan (kurang lebih 70%), riwayat merokok dihubungkan dengan peningkatan risiko secara bermakna terhadap terjadinya KNF secara keseluruhan,⁶ sedangkan pada penelitian yang dilakukan di Afrika Utara

dengan KNF tipe III mencapai 92%, jumlah rokok yang dihisap perhari berhubungan bermakna dengan peningkatan risiko KNF secara keseluruhan.⁷ Asap rokok yang mengalami aktivasi metabolik menyebabkan pembentukan *DNA adduct*, dimana terjadi ikatan metabolit karsinogen dengan DNA. *DNA adduct* merupakan proses karsinogen yang absolut. Jika *DNA adduct* keluar dari mekanisme *repair* dan menetap, akan menyebabkan *miscoding* permanen. Jika terjadi *miscoding* permanen, hal ini dapat menyebabkan mutasi onkogen dan deaktivasi *tumor suppressor gen*, yang menyebabkan kehilangan kontrol pertumbuhan yang normal dan terjadilah kanker.⁸

Gen *Harvey (H)-ras*, *Neuroblastoma (N)-ras*, dan *Kirsten (K)-ras* merupakan onkogen *ras* yang sering terdapat pada tumor manusia, dimana terdapat mutasi sebesar 20-25%. Mutasi bisa terjadi hanya pada 1 gen dari 3 gen *ras* tersebut.⁹ Mutasi *ras* juga akan meningkatkan produksi protein supresor tumor ARF. ARF akan berikatan dengan MDM-2 dan akan menghambat protein *p53*.¹⁰ Prevalensi perubahan *p53* pada keganasan kepala dan leher dilaporkan berkisar antara 39%-62%, dan perubahan gen *p53* tersebut berhubungan dengan 2 faktor risiko yaitu tembakau dan alkohol.¹¹

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara mutasi gen *ras* dan *p53* pada penderita KNF WHO tipe III stadium lanjut dengan riwayat merokok (jumlah rokok, lama merokok, paparan kumulatif rokok).

METODE

Penelitian ini adalah studi *cross sectional* melibatkan 30 subjek penelitian. Jaringan biopsi nasofaring diperoleh dari penderita KNF yang didiagnosis di poli THT RSUD dr. Saiful Anwar Malang sejak Oktober 2011-Mei 2012 dengan kriteria inklusi penderita KNF baru stadium lanjut (stadium III dan IV) menurut UICC 2002 dengan histopatologi karsinoma tanpa diferensiasi (WHO tipe III). Kriteria eksklusi adalah penderita KNF dengan riwayat minum alkohol (didefinisikan: minum alkohol minimal 3 hari dalam 1 minggu selama minimal 6 bulan) dan atau sudah pernah mendapat terapi (radioterapi dan atau kemoterapi). Variabel bebas penelitian terdiri dari: jumlah rokok yaitu jumlah batang rokok yang dihisap dalam 1 hari; lama merokok adalah lama penderita merokok sampai saat berhenti dihitung dalam tahun; paparan kumulatif rokok diperoleh dari hasil perkalian jumlah bungkus rokok per hari dikalikan lama merokok dalam tahun. Subjek penelitian dikategorikan memiliki riwayat merokok jika pernah merokok paling sedikit 1 batang rokok per hari selama minimal 6 bulan. Variabel tergantung penelitian ini adalah ada tidaknya mutasi gen *ras* dan *p53*.

Jaringan biopsi nasofaring dilakukan isolasi DNA kemudian dilakukan pemeriksaan *polymerase chain reaction* (PCR). Gen *H-*

ras menggunakan *forward primer*: 5'*gacgaatataagctggtgg-3'* dan *reverse primer*: 3'*taactaccctctgcacgga-5'*. Hasil PCR dilanjutkan dengan pemeriksaan *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) menggunakan enzim restriksi *Msp I* sedangkan gen *N-ras* kodon 61 menggunakan *forward primer*: 5'*gacatactggatacagctggc-3'* dan *reverse primer*: 5'*cctgtcctcatgtattggtc-3'*. Enzim restriksi untuk pemeriksaan RFLP *N-ras* adalah *MscI*. Pemeriksaan gen *p53* pada ekson 8 dengan *forward primer*: *cctcttgcttcttttcc-tatatcc* dan *reverse primer*: *cttggctcctcc-accgcttcttg*. Hasil PCR gen *p53* dilanjutkan RFLP dengan menggunakan enzim restriksi *Msp I*. Selanjutnya hasil *dirunning* pada gel agarose 2% dan adanya mutasi dilihat dari gambaran 2 pita pada hasil pemeriksaan RFLP.

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *Fisher's exact* untuk mengetahui adanya hubungan antara mutasi gen *ras* dan *p53* dengan riwayat merokok dan uji T untuk mengetahui hubungan mutasi gen *ras* dan *p53* dengan jumlah rokok, lama merokok dan paparan kumulatif rokok. Kemaknaan ditentukan berdasarkan nilai $p < 0,05$.

HASIL

Karakteristik subjek hasil penelitian ini kami uraikan berdasarkan kelompok usia, jenis kelamin, riwayat merokok dan stadium.

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian berdasarkan kelompok usia, jenis kelamin, riwayat merokok dan stadium KNF.

Karakteristik subjek penelitian	N	%
Kelompok usia		
11-20 tahun	1	3,33
21-30 tahun	2	6,67
31-40 tahun	5	16,67
41-50 tahun	10	33,33
51-60 tahun	6	20
61-70 tahun	5	16,67
71-80 tahun	1	3,33
Jenis kelamin		
Laki-laki	23	76,67
Perempuan	7	23,33
Riwayat merokok		
Ya	18	60
Tidak	12	40
Stadium KNF		
III	8	26,67
IVA	11	36,67
IVB	10	33,33
IVC	1	3,3

Hasil penelitian menunjukkan distribusi kelompok usia subjek penelitian terbanyak pada kelompok usia 41-50 tahun yaitu sebesar (33,33%) diikuti kelompok usia 51-60 tahun (20%), kelompok usia 31-40 tahun dan 61-70 tahun masing-masing sebesar 16,67%. Distribusi jenis kelamin menunjukkan jumlah laki-laki lebih banyak 23 (76,67%) dibandingkan perempuan 7 (23,33%). Riwayat

merokok didapatkan pada 18 (60%) subjek penelitian dan 12 (40%) tanpa riwayat merokok. Stadium IV didapatkan pada 22 (73,33%) subjek penelitian dan stadium III pada 8 (26,67%) subjek penelitian (tabel 1).

Tabulasi silang pada tabel 2 menunjukkan bahwa terdapat mutasi gen *H-ras* pada 1 dari 30 (3.3%) subjek penelitian yaitu pada penderita tanpa riwayat merokok. Hasil uji *Fisher exact* menunjukkan tidak terdapat hubungan yang bermakna ($p=0.400$) antara riwayat merokok dan tidak merokok terhadap mutasi gen *H-ras*. Pemeriksaan ada tidaknya mutasi *N-ras* hanya bisa diketahui pada 28 subjek. Dua subjek lainnya tidak dapat diketahui karena jaringan biopsinya sedikit. Mutasi *N-ras* terdapat pada 21 dari 28 (75%) subjek penelitian. Pada penderita tanpa riwayat merokok terjadi mutasi gen *N-ras* pada 10 dari 12 subjek penelitian, sedang dengan riwayat merokok terdapat 11 dari 16 subjek. Hasil uji *Fisher exact* menunjukkan tidak terdapat hubungan yang bermakna ($p=0.662$) antara riwayat merokok dan tidak merokok terhadap mutasi gen *N-ras*

Tabel 2. Distribusi frekuensi berdasarkan riwayat merokok dan terjadinya mutasi *H-ras* dan *N-ras*

Riwayat merokok	Mutasi <i>H-ras</i>				Mutasi <i>N-ras</i>				
	Tidak	Ya	Total	P	Tidak	Ya	Total	OD (95%CI)	P
Tidak	11	1	12	.400	2	10	12	.440	.662
Ya	18	0	18		5	11	16		
Total	29	1	30		7	21	28		

Tabel 3. Hasil uji t jumlah rokok perhari, lama merokok dan paparan kumulatif rokok terhadap mutasi *H-ras* dan *N-ras*

	Mutasi <i>H-ras</i>			Mutasi <i>N-ras</i>		
	Ya	Tidak	P	Ya	Tidak	P
Jumlah rokok perhari						
N	1	29	0.357	21	7	0.232
Mean	0.00	5.90		4.143	6.857	
SD		6.190		4.983	5.398	
Lama merokok						
N	1	29	0.373	21	7	0.469
Mean	0.00	17.07		12.381	23.428	
SD		18.520		17.976	18.238	
Paparan kumulatif rokok						
N	1	29	0.473	21	7	0.090
Mean	0.00	14.32		8.047	19.286	
SD		19.360		13.403	18.255	

Berdasarkan tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah rokok yang dihisap perhari pada subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi *H-ras* adalah 5.90 batang perhari, dengan SD sebesar 6.190. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *H-ras* tidak dipengaruhi oleh jumlah rokok yang dihisap ($p=0.357$). Rata-rata lama merokok pada subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi gen *H-ras* adalah 17.07 tahun dengan SD sebesar 18.520. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *H-ras* tidak dipengaruhi oleh lama merokok ($p=0.373$). Rata-rata paparan kumulatif rokok subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi gen *H-ras* adalah 14.32 bungkus rokok/tahun, dengan SD sebesar 19.360. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *H-ras* tidak dipengaruhi oleh paparan kumulatif rokok ($p=0.473$).

Berdasarkan tabel 3 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah rokok yang dihisap perhari pada subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 6.86 batang perhari dengan SD sebesar 5.398,

sedangkan pada subjek penelitian yang mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 4.143 batang perhari dengan SD sebesar 4.983. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* tidak dipengaruhi oleh jumlah rokok yang dihisap ($p=0.232$). Rata-rata lama merokok pada subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 23.428 tahun dengan SD sebesar 18.238, sedangkan subjek penelitian yang mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 12.381 tahun dengan SD sebesar 17.978. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* tidak dipengaruhi oleh lama merokok ($p=0.469$). Rata-rata paparan kumulatif rokok subjek penelitian yang tidak mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 19.2866 bungkus rokok/tahun, dengan SD sebesar 18.255, sedangkan pada subjek penelitian yang mengalami mutasi gen *N-ras* adalah 8.047 bungkus rokok/tahun dengan SD sebesar 13.403. Hasil uji t menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* tidak dipengaruhi oleh paparan kumulatif merokok ($p=0.090$).

Untuk pemeriksaan gen *p53*, dari 30 subjek penelitian, 1 subjek penelitian tidak dapat diketahui ada tidaknya mutasi *p53*; hal tersebut dimungkinkan karena jaringan biopsi yang hanya sedikit sehingga kadar proteinnya rendah dan pada pemeriksaan sampel tidak dapat dideteksi atau diketahui

ada tidaknya mutasi. Sebanyak 29 subjek penelitian selanjutnya dilakukan analisis. Dari 29 subjek penelitian tersebut, sebanyak 27 subjek penelitian (93,1%) mengalami mutasi *p53*, sedangkan 2 lainnya (6,9%) tidak mengalami mutasi *p53*.

Tabel 4. Distribusi frekuensi berdasarkan riwayat merokok dan terjadinya mutasi gen *p53*

Riwayat merokok	Mutasi gen <i>p53</i>				Total		OR (95% CI)	P value
	Ya		Tidak		n	%		
	n	%	n	%				
Ya	17	94,4	1	5,6	18	100	1,7	1,000
Tidak	10	90,9	1	9,1	11	100	(0,095-30,27)	
Jumlah	27	93,1	2	6,9	29	100		

Hasil tabulasi silang antara riwayat merokok dengan terjadinya mutasi *p53* memperoleh hasil bahwa sebanyak 17 (94,4%) subjek penelitian dengan riwayat merokok mengalami mutasi *p53*, sedangkan subjek penelitian yang tidak memiliki riwayat merokok terdapat 10 (90,9%) yang mengalami mutasi *p53*. Hasil uji *Fisher's exact* menunjukkan bahwa tidak ada hubungan signifikan antara riwayat merokok dengan terjadinya mutasi gen *p53* ($p=1,000$) (tabel 4).

Hasil uji T mendapatkan nilai $p=0,981$ untuk variabel jumlah rokok yang dikonsumsi

perhari, nilai $p=0,613$ untuk variabel lama merokok dan nilai $p=0,864$ untuk variabel paparan kumulatif rokok. Sehingga disimpulkan tidak ada perbedaan signifikan rata-rata jumlah rokok yang dikonsumsi per hari, lama merokok dan paparan kumulatif rokok antara subjek penelitian yang mengalami mutasi *p53* dan yang tidak mengalami mutasi *p53*. Nilai *mean* dan *SD* dari 3 variabel tersebut baik dari subjek penelitian yang mengalami mutasi dan tidak mutasi *p53* dapat dilihat di tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji T jumlah rokok, lama merokok dan paparan kumulatif rokok terhadap mutasi gen *p53*

	Mutasi gen <i>p53</i>				P value
	Ya		Tidak		
	n=27		n=2		
	Mean	SD	Mean	SD	
Jumlah rokok (batang/hari)	5,89	6,203	6,00	8,485	0,981
Lama merokok (tahun)	16,41	18,135	23,50	33,324	0,613
Paparan kumulatif rokok (bungkus-tahun)	14,49	19,802	12,00	16,971	0,864

DISKUSI

Sampel yang dikumpulkan sebanyak 30 subjek dengan usia terbanyak diatas 40 tahun (73,3%). Penderita laki-laki didapatkan lebih banyak (76,7%) dibandingkan penderita perempuan. KNF dapat ditemukan pada semua umur, namun insiden tertinggi pada dekade 5 dengan rasio laki-laki dan wanita sebesar 2:1.³ Dari 30 penderita yang dijadikan sampel, sebagian besar sudah memasuki stadium IV A (36.7%), stadium IV B (33.3%) dan stadium III (26.7%), yang ketiganya termasuk stadium lanjut. Berdasarkan stadium, pada tahun 2008 - 2010, penderita KNF di RSUD dr. Saiful Anwar stadium I sebanyak 1 kasus (0,81%), stadium II sebanyak 6 kasus (4,88%), stadium III sebanyak 47 kasus (38,21%) dan stadium IV sebanyak 69 kasus (56,10%).⁴ Penderita KNF dengan riwayat merokok sebesar 60%, sedang tanpa riwayat merokok sebesar 40%.

Pada penelitian ini, mutasi *H-ras* hanya terjadi pada 1 dari 30 subjek penelitian, sedang mutasi *N-ras* terjadi pada 75% subjek. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* sendiri dapat menyebabkan peningkatan proliferasi sel sehingga dapat menyebabkan keganasan. Hal ini sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* banyak terjadi pada keganasan kepala dan leher. Mutasi *N-ras* dapat mencegah fosforilasi *c-myc* yang diperantarai oleh *glycogen synthase kinase-3* sehingga akan meningkatkan proliferasi sel. Keganasan yang berbeda akan mengakibatkan perbedaan dalam frekuensi dan spektrum mutasi *H-ras*, *N-ras* maupun *K-ras*.¹²

Mutasi gen *H-ras* terdapat pada 1 sampel pada penderita KNF tanpa riwayat merokok. Hasil pengujian dengan *Fisher exact test* diperoleh $p=0.400$ ($p>0.05$), hal ini menunjukkan bahwa mutasi *H-ras* tidak dipengaruhi oleh riwayat merokok. Hal ini dikarenakan terjadinya mutasi gen *H-ras* banyak terjadi pada keganasan kepala dan leher dengan tipe karsinoma sel skuamosa.⁹ Menurut penelitian yang dilakukan di Amerika, hanya pada penderita KNF WHO tipe I saja yang dipengaruhi oleh rokok.⁵ Mutasi *H-ras* akan mengaktifkan jalur P13K dimana jalur ini berperan sebagai anti apoptosis dan peningkatan daya tahan hidup sel. Selain itu, mutasi *H-ras* akan mempengaruhi siklus sel pada fase G2-M yang menyebabkan pembelahan sel tidak bisa dihambat sehingga populasi sel meningkat.¹³

Mutasi gen *N-ras* terjadi pada 10 (83.3%) dari 12 sampel dari penderita KNF tanpa riwayat merokok dan 11 (68.8%) dari 16 sampel dari penderita KNF dengan riwayat merokok. Hasil pengujian dengan *Fisher exact test* diperoleh $p=0.662$ ($p>0.005$), hal ini menunjukkan bahwa mutasi *N-ras* tidak dipengaruhi oleh riwayat merokok. Hal ini menunjukkan bahwa merokok bukan merupakan salah satu faktor penyebab langsung mutasi gen, tetapi lebih merupakan faktor risiko terjadinya keganasan. Dari berbagai jalur sinyal gen *ras* yang teraktivasi akibat mutasi gen *ras*, ini menunjukkan bahwa gen *ras* berperan baik pada inisiasi, promosi dan fase lanjut keganasan.

Penelitian yang dilakukan pada melanoma yang muncul setelah injeksi retrovirus, mutasi *N-ras* paling banyak terjadi bila dibandingkan mutasi *H-ras* dan *K-ras*. Nitrosamin spesifik tembakau pada beberapa penelitian terhadap keganasan kepala dan leher akan menyebabkan terjadinya mutasi *H-ras* yang nantinya akan berkembang menjadi keganasan kepala leher tipe karsinoma sel skuamosa.¹⁴ Pada penelitian ini didapatkan hasil yang serupa dimana mutasi *N-ras* lebih banyak daripada mutasi *H-ras*. Hal tersebut kemungkinan karena adanya virus sebagai faktor penyebab yang paling erat pada KNF WHO tipe III.¹⁵ Virus EB dapat mengekspresikan gen *BamH I-A right frame 1* (BARF1) yang mampu menginduksi transformasi ke arah keganasan dengan menginaktivasi *p53* dan *pRb*, serta over-ekspresi *H-ras*.¹⁶

Kejadian mutasi *H-ras* juga tidak dipengaruhi oleh jumlah rokok yang dihisap perhari ($p=0.35$), lama merokok ($p=0.37$) maupun paparan kumulatif rokok ($p=0.47$). Demikian juga dengan kejadian mutasi *N-ras* juga tidak dipengaruhi oleh jumlah rokok yang dihisap perhari ($p=0.23$), lama merokok ($p=0.46$) maupun paparan kumulatif rokok ($p=0.09$). Hal ini tidak sesuai dengan literatur, di mana jumlah rokok yang dihisap dapat meningkatkan risiko terjadinya KNF.⁵ Ini bisa dijelaskan oleh karena ada patomekanisme terjadinya mutasi *H-ras* dan *N-ras* melalui jalur lain yang bisa menyebabkan keganasan. Karsinogen dalam tembakau bisa berikatan secara langsung dengan

reseptor tertentu yang dapat menyebabkan aktivasi faktor pengatur sel seperti *Akt*.⁸ *Akt* ini akan mempromosikan daya tahan hidup dan mencegah apoptosis pada beberapa tipe sel. *Akt* akan memfosforilasi *BAD*, salah satu *family bcl-2* yang bersifat pro-apoptosis. *BAD* yang tersfosforilasi akan menghambat proses apoptosis. Selain itu *Akt* juga akan memfosforilasi *Forkhead* (FKHR) yang mengakibatkan daya hidup sel memanjang. *Akt* juga akan memfosforilasi MDM2, MDM2 merupakan onkogen yang merupakan gen yang bisa mengamplifikasi jumlah kanker dan bisa mendegradasi *p53*. Dengan terdegradasinya *p53* maka apoptosis tidak terjadi.¹⁰

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dari 29 subjek penelitian yang dapat dianalisis, 93.1% mengalami mutasi *p53* sedangkan sisanya 6.9% tidak mengalami mutasi. Frekuensi mutasi *p53* ditemukan banyak pada keganasan di manusia, namun angka terjadinya mutasi *p53* yang didapatkan pada KNF biasanya lebih rendah (10%) dibandingkan tumor lainnya.¹⁷

Mutasi *p53* ekson 8-9 didapatkan pada 93.1% penderita KNF WHO tipe III pada penelitian ini. Studi yang dilakukan untuk mengevaluasi peran *p53* pada KNF pada umumnya melaporkan *p53 wild type*, meskipun 31-95% spesimen biopsi protein *p53* menunjukkan *overexpression* pada pewarnaan imunohistokimia.¹⁷ Beberapa studi mengenai perubahan *p53* pada KNF menunjukkan jumlah persentase yang rendah

(kurang dari 20%) atau tidak ada mutasi pada jaringan KNF penderita yang berasal dari Kaukasia, Amerika Afrika, Arab, Cina, Hong Kong dan Taiwan, sedangkan studi di Hongkong, Afrika Utara, Turki dan Thailand mengenai ekspresi *p53* pada jaringan KNF menunjukkan adanya *overexpression* pada 70-90% jaringan. Penelitian Hoe et al¹⁸ yang dilakukan di Malaysia menemukan bahwa dari 53 sampel KNF tidak ditemukan mutasi *p53* pada ekson 5 sampai 8, meskipun 87% dari sampel tersebut menunjukkan intensitas tinggi pada pewarnaan *p53* dengan teknik imunohistokimia.

Penelitian Agaoglu et al¹⁷ yang dilakukan di Turki mengenai *overexpression p53* melaporkan bahwa dari 97 sampel KNF yang dilakukan pewarnaan imunohistokimia terhadap *p53* didapatkan hasil 85.5% sampel terwarnai sedangkan sisanya 14.5% tidak terwarnai, namun tidak ada korelasi yang signifikan antara ekspresi *p53* dan distribusi tipe histologi, stadium, usia dan jenis kelamin. Sel tumor dapat mengalami mutasi *p53* ataupun tidak. Gen *p53* juga dapat dimodulasi berupa inhibisi atau mengalami inaktivasi akibat interaksi dengan protein-protein virus dan beberapa protein seluler.¹⁹

Penelitian yang dilakukan Khabir et al²⁰ di Tunisia (Afrika Utara) melaporkan bahwa sebanyak 81% pasien KNF usia lebih dari 30 tahun jaringan biopsinya positif terwarnai dengan pemeriksaan imunohistokimia *p53*; dan hanya 38% pasien KNF usia kurang dari

30 tahun yang jaringan biopsinya positif terwarnai. Hal tersebut mungkin dapat dijelaskan melalui adanya interaksi tumor dan virus yang memiliki karakteristik tersendiri. Pada subjek penelitian ini, sebanyak 24 (88.89%) subjek berusia lebih dari 30 tahun dan 3 (11,11%) subjek berusia kurang dari 30 tahun yang mengalami mutasi gen *p53*. Pada kelompok populasi usia lebih dari 30 tahun dimungkinkan adanya genom virus EBV yang lebih banyak dan kadar anti VCA EBV IgA serta anti EA EBV yang tinggi. Hal tersebut berperan pada penghindaran proses apoptosis dan transformasi sel menjadi ganas.

Beberapa studi yang memeriksa mutasi *p53* pada KNF di populasi Asia dan Afrika Utara dengan metode PCR-*single strand conformational polymorphism* (SSCP) dan pemotongan DNA hanya menemukan mutasi *p53* dalam jumlah yang sedikit (kurang dari 10%), meskipun ada studi yang menemukan dalam jumlah lebih tinggi, namun tidak lebih dari 25% kasus.²⁰

Paparan bahan kimia tertentu seperti BaP, PAH yang menyebabkan kerusakan DNA dapat menimbulkan mutasi *p53*.²¹ Aktivasi onkogen yang menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) dapat menyebabkan kerusakan DNA. Mutasi *p53* juga dapat terjadi melalui mutagenesis endogen karena pembentukan ROS akibat inflamasi kronis.²²

Gen *p53*-MDM2-ARF membentuk regulasi lengkungan umpan balik (*auto-regulatory feedback loop*). Pada kondisi sel

yang tidak mengalami stres, MDM2 dan *p53* membentuk keseimbangan satu sama lain dan ditemukan dalam kadar yang rendah. Protein MDM2 mensupresi *p53* melalui beberapa mekanisme yaitu: MDM2 berikatan dengan *p53* sehingga kemampuan *p53* untuk transaktivasi gen target menjadi hilang, protein MDM2 secara langsung melakukan *nuclear export* dari kompleks *p53*/MDM2, MDM2 bekerja sebagai *ubiquitin ligase* yang diperlukan untuk degradasi *p53*. Lingkaran umpan balik antara *p53*-MDM2-ARF adalah proses yang kompleks melibatkan interaksi protein-protein tersebut. Mutasi *p53* menyebabkan defisiensi transaktivasi *p53*. Inhibisi proses transkripsi protein MDM2 misalnya oleh sinar UV menyebabkan peningkatan *p53*. Modifikasi protein MDM2 melalui fosforilasi menyebabkan proses pengikatan MDM2-*p53* tidak efisien sehingga meningkatkan kadar *p53*. Induksi protein $p14^{ARF}$ akan menghambat protein MDM2 yang selanjutnya akan meningkatkan kadar *p53*. Myc, Ras, E2F-1 akan memicu terbentuknya protein $p14^{ARF}$ sedangkan *p53* akan menghambat protein $p14^{ARF}$. Kondisi lain yang dapat terjadi adalah modifikasi N-terminus *p53* melalui fosforilasi menyebabkan berkurangnya ikatan dengan MDM2. Adanya proses yang menyebabkan kerusakan DNA menimbulkan akumulasi *p53*, dan interaksi antara gen *p53*-MDM2-ARF jika mengalami gangguan akan mempengaruhi *p53* yang memungkinkan *p53* tersebut mengalami mutasi.²³ Gangguan jalur interaksi

p53-MDM2-ARF juga memungkinkan terjadinya perubahan *p53* yang salah satunya adalah mutasi *p53*. Kondisi yang terjadi akibat mutasi *p53* tersebut adalah terjadinya apoptosis yang terhambat, proliferasi sel yang terus berjalan serta siklus sel yang tidak berhenti. Adanya mutasi *p53* tersebut diduga ikut berkontribusi pada proses karsinogenesis KNF.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata jumlah rokok yang dikonsumsi pada subjek penelitian yang mengalami mutasi *p53* hampir sama jumlahnya dengan yang tidak mengalami mutasi *p53* (5.89 batang/hari dan 6.00 batang/hari). Rata-rata lama merokok pada subjek yang tidak mengalami mutasi *p53* lebih lama dibandingkan dengan yang mengalami mutasi gen *p53* (23.50 tahun dan 16.41 tahun). Rata-rata paparan kumulatif rokok subjek penelitian yang mengalami mutasi *p53* lebih besar dibandingkan yang tidak mengalami mutasi gen *p53* (14.49 bungkus-tahun dan 12.00 bungkus-tahun). Untuk ketiga variabel tersebut (jumlah rokok, lama merokok, paparan kumulatif rokok) sama-sama nilai $p > 0.05$ sehingga mutasi *p53* pada penderita KNF WHO tipe III yang terjadi tidak menunjukkan adanya hubungan yang signifikan dengan ketiga variabel tersebut.

Hasil penelitian ini sesuai dengan satu studi di Amerika Serikat yang dikutip oleh Chang dan Adami, bahwa dua per tiga kasus KNF WHO tipe I ditemukan kaitannya dengan merokok sedangkan KNF WHO tipe II dan III tidak berhubungan dengan

merokok. Beberapa studi *case control* yang meneliti asap rokok dan risiko terjadinya KNF pada berbagai populasi; melaporkan bahwa terjadi peningkatan risiko 2-6 kali lipat pada populasi yang merokok, meskipun beberapa studi yang lain tidak menemukan hubungan.⁵

Hasil penelitian ini mendapatkan mutasi *p53* tidak menunjukkan adanya hubungan signifikan dengan riwayat merokok (jumlah rokok, lama merokok serta paparan kumulatif rokok). Karsinogen yang terdapat di asap rokok akan mengalami aktivasi metabolik sehingga terjadi *DNA adduct*. *DNA adduct* yang tidak mengalami perbaikan akan tetap ada atau persisten atau mengalami *miscoding*. Hal tersebut dapat menyebabkan mutasi onkogen atau gen-gen lain selain *tumor suppressor gen* sehingga terjadi keganasan. Selain itu bahan karsinogen nitrosamin dapat berikatan dengan reseptor tertentu yang menyebabkan aktivasi *cellular regulatory factor* misalnya *Akt*. Aktivasi *Akt* akan memicu MDM2 yang kemudian menghambat *p53* dengan hasil akhir terjadi penurunan apoptosis.²⁴ Mutasi onkogen misalnya *ras*, *myc*, *β-catenin* akan meningkatkan produksi ARF (*tumor suppressor protein*) yang selanjutnya berikatan dengan MDM2 sehingga menghambat proses *polyubiquitination* dengan *p53*. Proses tersebut meningkatkan aktivitas *p53* dengan hasil akhir apoptosis. MDM2 dan *p53* membentuk *autoregulatory*

feedback loop sehingga hasil akhir aktivitas *p53* yang menyebabkan apoptosis; dan proses yang terjadi tergantung selektivitas terhadap respon stres dengan program transkripsi yang berbeda.¹⁰

Pada penelitian yang dilakukan pada penderita KNF WHO tipe III stadium lanjut ini disimpulkan mutasi *N-ras* (75%) terjadi lebih banyak dibandingkan mutasi *H-ras* (3,33%), sedangkan mutasi *p53* terjadi pada 93,1% penderita tersebut. Selain itu didapatkan bahwa merokok tidak berhubungan secara bermakna dengan terjadinya mutasi gen *H-ras*, *N-ras* dan *p53* pada KNF, hal ini disebabkan karena KNF merupakan salah satu keganasan kepala leher yang disebabkan oleh multifaktor terutama infeksi virus EB, genetik dan peranan lingkungan. Secara analisa statistik tidak didapati adanya hubungan signifikan antara jumlah rokok yang dikonsumsi per hari, lama merokok dan paparan kumulatif rokok terhadap dengan terjadinya mutasi gen *N-ras*, *H-ras* dan *p53*. Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian lain untuk mengevaluasi faktor-faktor risiko lain sebagai penyebab mutasi gen *H-ras*, *N-ras* dan *p53* (faktor eksogen dan faktor endogen yang dapat mempengaruhi gen *ras*, *p53*). Salah satunya adalah melalui jalur lengkungan umpan balik *p53*-MDM2-ARF dan jalur lainnya yang melibatkan gen *ras* pada penderita KNF.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wei WI, Sham JST. Cancer of the nasopharynx. In: Myers EN, Suen JY, Myers JN, Hanna EYN, editors. *Cancer of the head and neck*. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 229-4
2. Asroel HA. Penatalaksanaan radioterapi pada karsinoma nasofaring. Medan : Fakultas Kedokteran Bagian THT Universitas Sumatera Utara. [cited 2011, Mei]; 1-11. Available from: <http://library.usu.ac.id/fk/tht-hary2.pdf>.
3. Mulyoarjo. Diagnosis dan penatalaksanaan karsinoma nasofaring. In: Mulyoarjo, Soedjak S, Wisnubroto, Harmadji S, Hasanusi R, Ariono, editors. *Naskah Lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan III Ilmu Kesehatan THT-KL*. Surabaya; 2002. p. 38-48
4. Laporan Tahunan SMF IK THT-KL. RS dr. Saiful Anwar Malang. 2010.
5. Chang ET, Adami HO. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidem Biomar* 2006; 15:1765-77.
6. Ekhburanawat W, Ekpanyaskul C, Brennan P, Kanka C, Tepsuwan K, Temiyastith S, et al. Evaluation of non-viral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Thailand: Result from a case-control study. *Asian Pacif J Cancer Prev* 2010; 11:929-32.
7. Feng BJ, Khyatti M, Ben AW, Dahmoul S, Ayad M, Maachi F, et al. Cannabis, tobacco and domestic fumes intake are associated with nasopharyngeal carcinoma in North Africa. *British J Cancer* 2009; 101:1207-12
8. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. *J Semcancer* 2004; 14:473-86.
9. Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer* 2011; 2(3):344-58.
10. Levine AJ, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor genes. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB, editors. *The molecular basis of cancer*. 3th ed. Philadelphia: Saunders; 2008. p. 31-8.
11. Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, Morris WA, Turek LP, Haugen TH, et al. Association between p53 and human papilloma virus in head and neck cancer survival. *Cancer Epidem Biomar* 2008; 17(2):421-7.
12. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alteration in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12(7):2301-6.
13. Choudhary S, Wang HCR. Proapoptotic ability of oncogenic H-ras to facilitate apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(3):1099-111.
14. Chang KW, Sarraj S, Lin SC, Tsai PE, Solt D. p53 expression, p53 and Ha-ras mutation and telomerase activation during nitrosamine-mediated hamster pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21(7):1441-51.
15. Tse LA, IT-S Y, OW KM, Wong SL. Incidence rate trends of histological subtypes of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *British J Cancer* 2006; 95:1269-73
16. Jiang R, Cabras G, Sheng W, Zeng Y, Ooka T. Synergism of BARRF1 with ras induced malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia* 2009; 9:964-73.
17. Agaoglu FY, Dizdar Y, Dogan O, Alatlı C, Ayan I, Savci N, et al. p53 overexpression in nasopharyngeal carcinoma. *In vivo* 2004; 18:555-60.
18. Hoe SLL, Lee ES, Khoo ASB, Peh SC. p53 and nasopharyngeal carcinoma : a Malaysian Study. *Pathology* 2009; 41(6):561-5
19. Brennan B. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:23.
20. Khabir A, Sellami A, Sakka M, Ghorbel AM, Daoud J, Frikha M, et al. Contrasted frequencies of p53 accumulation in two age groups of north african nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6:3932-36.
21. Ahrendt SA, Chow JT, Yang SC, Wu L, Zhang M,J., Jen J, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000; 60:3155-9.
22. Robles AI, Linke SP, Harris CC. The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21:6898-907.
23. Ljungman M. Dial 9-1-1 for p53: Mechanism of p53 Activation by cellular stress. *Neoplasia* 2000; 2(3):208-25
24. Bafico A, Grumotolo L, Aaronson SA. Oncogenes and signal transduction. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Gray JW, Thompson CB, editors. *The Molecular basis of cancer*. 3th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008. p. 17-30.