

Hubungan antara Ekspresi Protein P16 dan Ki67 dengan Faktor Prognostik Histopatologik Melanoma Malignum Kulit Jenis Nodular

Riesye Arisanty, Budiana Tanurahardja, Mpu Kanoko

*Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
 Jakarta*

ABSTRAK

Latar belakang

Pemahaman mengenai karakteristik biologik dan faktor prognostik melanoma malignum yang merupakan tumor ganas melanositik merupakan hal yang penting karena berhubungan dengan pemilihan terapi serta kesintasan penderita. Agresivitas tumor dapat dinilai dari beberapa faktor histopatologik, antara lain: adanya ulserasi, aktivitas mitosis, dan keterlibatan kelenjar getah bening. Protein p16 dan ki67 merupakan yang memiliki peran dalam prediktif prognostik melanoma malignum. Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan antara ekspresi protein p16 dan Ki67 pada beberapa faktor prognostik histopatologik yang dapat digunakan sebagai penanda agresivitas tumor yaitu ulserasi, aktivitas mitosis dan metastasis pada tumor primer melanoma malignum jenis nodular.

Metode

Penelitian ini merupakan studi potong lintang dengan metode imunohistokimia menggunakan p16 dan Ki67 pada 25 kasus melanoma malignum jenis nodular.

Hasil

Ekspresi protein p16 negatif ditemukan pada 40% kasus melanoma ulseratif, 52% kasus dengan aktivitas mitosis tinggi, dan 16% kasus pada metastasis kelenjar getah bening (KGB). Ekspresi Ki67 positif pada 44% kasus melanoma dengan aktivitas mitosis tinggi, dan 20% kasus melanoma metastasis serta 32% kasus dengan ulserasi.

Kesimpulan

Pada melanoma malignum kulit jenis nodular tidak ditemukan hubungan antara ekspresi p16 dan Ki67 dengan gambaran ulserasi, aktivitas mitosis, dan metastasis KGB.

Kata kunci: aktivitas mitosis, faktor prognostik histopatologik, Ki67, melanoma malignum, melanoma nodular kutaneus, p16.

ABSTRACT

Background

To understanding about biological behaviour and prognostic factor of melanoma malignum as a malignant tumor from melanocyte was important, because its relationship with choise of therapy and survival of the patiens. The aggressivity of the tumour, can be predicted from several prognostic factors such as: ulceration of the tumour, mitotic activity, and lymph nodes metastasis. P16 and Ki67 protein expressions can be used as a prognostic markers in cutaneous nodular melanoma malignum.

Aim

Assesing p16 and Ki67 protein expression and its relatinoship with several histopatological prognostic factors as a marker of aggressiveness of the tumors: ulceration, mitotic activity, and lymph nodes metastasis in cutaneous nodular melanoma malignum.

Methods

This was a cross-sectional study on 25 cases of nodular melanoma, stained with p16 and Ki67 antibody with immunohistochemical methods.

Results

P16 negative expression can be found in 40% of ulcerated melanoma cases, and 52% cases with high mitotic activity and 16% of cutaneous nodular melanoma with lymph nodes metastasis. Ki67 positive expression was found in 44% of cases with high mitotic activity, 20% cases of metastasis melanoma and 32% cases in ulcerated melanoma.

Conclusion

There was no statistically significant association between p16 and Ki67 expression with ulcerated melanoma, mitotic activity, and metastatic melanoma in lymph nodes.

Key words: cutaneous nodular melanoma, histopathologic prognostic factors, Ki67, malignant melanoma, mitotic activity, p16.

PENDAHULUAN

Melanoma malignum (MM) kulit merupakan kelompok tumor melanositik tersering setelah karsinoma sel basal dan karsinoma sel skuamosa. Berdasarkan data Badan Registrasi Kanker tahun 2008, melanoma tumor tersering ketiga pada pria dan wanita di Indonesia. *American Academy of Dermatology (AAD)* melaporkan MM merupakan tumor ganas tersering keenam pada tahun 2010. Selain itu, dilaporkan juga bahwa ditemukan 68.000 kasus baru per tahun yang merupakan 4% penyebab kematian akibat keganasan di Amerika. Menurut *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, pada tahun 1998-2002 di Queensland-Australia, memiliki angka kejadian melanoma malignum invasif tertinggi di dunia.²

Mutasi gen *CDKN2A/16ink4a* sangat berperan dalam perubahan sel melanosit menjadi ganas. Gen *p16ink4a* mengalami inaktivasi yang akhirnya mengakibatkan proliferasi sel.³ Gen *CDKN2A* terdapat pada kromosom 9p21 dan berhubungan erat dengan regulasi siklus sel khususnya jalur Rb. Gen *p16* berikatan dengan protein *CDK4/6* yang berperan dalam menghambat kompleks enzim siklin D dan *CDK4/6*. Kompleks tersebut dibutuhkan dalam proses fosforilasi protein pRb dan E2F. Pada keadaan hipofosforilasi ikatan pRb dan E2F akan terlepas, sehingga terjadi penekanan fungsi E2F sebagai faktor transkripsi. Berbagai penelitian menyebutkan bahwa inaktivasi gen *p16* berhubungan dengan metilasi promotor dan mutasi titik. Penurunan ekspresi sampai hilangnya *p16* berhubungan dengan stadium lanjut perkembangan melanoma serta penurunan ketahanan hidup. Perubahan ekspresi *p16* juga berhubungan dengan agresivitas dan prognosis yang buruk pada berbagai tumor seperti karsinoma yang berasal dari pankreas, karsinoma sel skuamosa dari esofagus, leukemia dan karsinoma yang berasal dari paru.⁴⁻⁷

Penilaian aktivitas proliferasi dilakukan dengan melihat ekspresi Ki67. Protein ini merupakan kelompok nonhiston yang diproduksi pada akhir fase G1, S, G2 dan M dalam siklus sel. Pada melanoma, penilaian ekspresi Ki67 berhubungan dengan risiko terjadinya metastasis serta penurunan ketahanan hidup pasien.⁸⁻¹⁰ Beberapa penelitian menyebutkan bahwa *p16* dan Ki67 merupakan penanda yang berguna untuk menilai potensi terjadinya metastasis pada melanoma primer.¹¹⁻¹²

Peningkatan pemahaman tentang karakteristik biologik dan faktor prognostik memiliki peranan penting, terutama berhubungan dengan respon terapi dan ketahanan hidup pasien. Terdapat 3 kelompok faktor prognostik, yaitu berdasarkan klinik (antara lain: umur, lokasi, jenis kelamin), histopatologik (antara lain: ketebalan lesi, ulserasi, kedalaman invasi, keterlibatan kelenjar getah bening/KGB, aktivitas mitosis), dan genetik.¹³ Dalam berbagai literatur telah disebutkan bahwa kedalaman tumor secara Breslow merupakan faktor prognosis yang dominan dalam melakukan prediksi timbulnya rekurensi dan ketahanan hidup pasien melanoma. Walaupun demikian, penilaian adanya ulserasi juga merupakan faktor penting selain sebagai faktor prediktor terjadinya penyebaran pada KGB regional yang juga merupakan parameter agresivitas melanoma.¹⁴

Tujuan dari penelitian ini untuk melihat hubungan antara ekspresi *p16* dan Ki67 dengan beberapa faktor prognostik histopatologik sebagai penanda agresivitas melanoma, yaitu ulserasi, aktivitas mitosis serta metastasis KGB pada MM jenis nodular.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi analitik potong lintang pada 25 kasus MM selama tahun 2000-2012 di Rumah Sakit Dr. Cipto Mangunkusumo. Kriteria penerimaan sampel adalah kasus dengan diagnosis MM jenis nodular dengan kondisi blok parafin yang masih baik dan memungkinkan dilakukan proses pewarnaan imunohistokimia. Prosedur yang dilakukan dimulai dengan melakukan penilaian ulang sediaan dengan pewarnaan hematoxil-eosin (HE) untuk melihat adanya ulserasi yaitu hilangnya lapisan epidermis di daerah tumor. Dilakukan pula penghitungan jumlah mitosis per 5 lapang pandang besar (LPB), serta adanya keterlibatan KGB baik mikro ataupun makro metastasis. Seluruh sediaan dilakukan penilaian ekspresi protein *p16* dan Ki67 dengan pewarnaan imunohistokimia. Berdasarkan hasil optimasi, proses inkubasi dilakukan *overnight* menggunakan antibodi primer *mouse monoclonal antibody p16* (Biogenex, pengenceran 1:1000) dan *rat antimouse monoclonal antibody Ki-67* (Novocastra, pengenceran 1:100). Inkubasi antibodi sekunder dengan *Starr Trek Universal Detection system* (Biocare) serta

kromogen 3 amino-9-ethyl carbazole (AEC) selama 30 menit.

Penilaian hasil dilakukan oleh dua pengamat. Apabila terdapat perbedaan, penilaian dilakukan berdasarkan konsensus. Penilaian hasil pulasan p16 menggunakan index pewarnaan yang merupakan perkalian antara intensitas pewarnaan dengan positivitas sel tumor pada 500 sel tumor yang mengekspresikan protein p16 dengan warna merah pada inti dan atau sitoplasma. Hanya ekspresi positif di daerah inti yang dianggap sebagai *true positif* sesuai dengan penelitian oleh Talve, dkk.¹⁵ Penilaian intensitas pewarnaan yaitu: nilai 0 (negatif), 1 lemah, 2 sedang, dan 3 kuat. Sedangkan positivitas inti yaitu: nilai 0 apabila tidak ada sel tumor yang terpulsa positif, 1 sel tumor yang terpulsa positif <10%, 2 sel tumor positif 10-50%, dan nilai 3 apabila sel tumor terpulsa positif >50%.¹⁶ Ekspresi Ki67 dikelompokkan menjadi ekspresi positif dan negatif dengan nilai titik potong pada 20% sesuai dengan penelitian Pearl dkk.¹⁷ Hasil pulasan Ki67 dinilai positif apabila >20% sel tumor dengan ekspresi positif inti dan negatif bila <20% ekspresi inti. Data yang diperoleh dianalisa menggunakan uji *Fisher's exact*, dan data tambahan ekspresi p16 dan Ki67 pada tumor sekunder yang merupakan data 2 kelompok berpasangan diuji dengan menggunakan uji *Mc. Nemar*. Penelitian ini juga telah lolos uji etik

dari badan terkait di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia tertanggal 9 Januari 2012.

HASIL

Dari 25 sampel penelitian, 13 pasien (52%) adalah laki-laki dan 12 pasien (48%) perempuan (Tabel 1). Pasien berusia antara 24-89 tahun dengan rerata usia 55 tahun. Lima puluh enam % kasus (14 kasus) berlokasi di daerah ekstremitas atas, 5 kasus di ekstremitas bawah sedangkan sisanya pada daerah kulit lainnya.

Tabel 1. Karakteristik Umum Melanoma Malignum jenis nodular

Keterangan klinik		Frekuensi	Persentase
Jenis kelamin	Laki-laki	13	52
	Perempuan	12	48
Usia	< 60 tahun	16	64
	≥ 60 tahun	9	9
Lokasi	Ekstremitas	19	76
	Lainnya	6	24

Hasil pulasan protein p16 pada seluruh kasus menunjukkan 2 jenis imunoreaktivitas yaitu pada inti dan sitoplasma dengan berbagai derajat intensitas pewarnaan. Umumnya ekspresi p16 tersebar homogen pada daerah tumor. Pada penelitian ini analisa statistik hanya dilakukan pada ekspresi di daerah inti, karena masih terdapat pendapat para ahli yang kontroversial mengenai ekspresi di sitoplasma.

Tabel 2. Ekspresi protein p16 dan Ki67 pada beberapa faktor prognostik histopatologik melanoma malignum nodular.

Faktor Prognostik Histopatologik	Ekspresi p16			Ekspresi Ki67		
	Positif	Negatif	p	Positif	Negatif	p
Ulserasi	positif	6(24%)	0,374	8(32%)	8(32%)	1,000
	negatif	2(8%)		4(16%)	5(20%)	
Aktivitas mitosis	tinggi	6(24%)	0,651	11(44%)	8(32%)	0,378
	rendah	2(8%)		4(16%)	2(4%)	
Metastasis kgb	positif	4(16%)	0,193	5(20%)	3(12%)	0,673
	negatif	4(16%)		13(32%)	8(32%)	

Enam belas kasus dari 25 kasus sampel penelitian memiliki gambaran mikroskopik ulserasi. Sepuluh kasus MM dengan ulserasi tidak mengekspresikan p16, sedangkan 6 kasus lainnya menunjukkan ekspresi p16 positif (Gambar 1). Analisa statistik menggunakan uji *Fisher's* menunjukkan tidak ada hubungan antara ulserasi dengan ekspresi p16 (p=0,374) dan Ki67 (p=1,00).

Penghitungan jumlah mitosis per 5 lapang pandang besar (LPB) dikategorikan menjadi aktivitas mitosis tinggi dan rendah

berdasarkan titik potong pada 5 mitosis per 5 LPB. Sebanyak 19 kasus (76%) diantara 25 kasus menunjukkan aktivitas mitosis tinggi. Tiga belas kasus (52%) di antaranya tidak mengekspresikan protein p16. Empat di antara 6 kasus pada kelompok dengan aktivitas mitosis rendah juga tidak menunjukkan ekspresi p16. Hasil uji asosiasi secara statistik menunjukkan p=0,651.

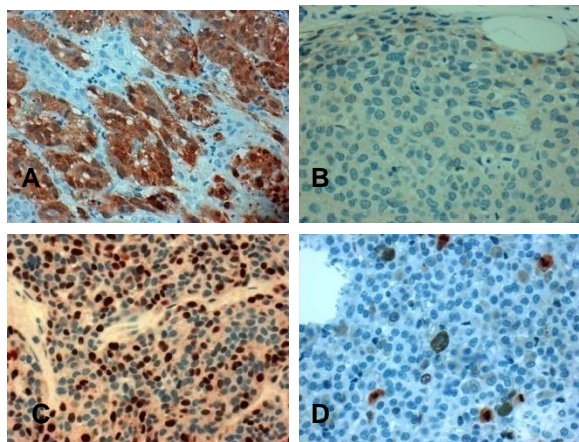
Pada 8 kasus melanoma malignum jenis nodular yang disertai keterlibatan KGB, 4 kasus di antaranya tidak mengekspresikan protein p16,

sedangkan 4 kasus lainnya menunjukkan ekspresi p16 positif. Penghitungan nilai kemaknaan secara statistik dengan uji Fisher juga tidak menunjukkan nilai kemaknaan.

Ekspresi Ki67 pada kasus penelitian ini umumnya tersebar heterogen dengan kisaran positivitas antara 0-80%, dan nilai median 23%. Terdapat 52% atau sebanyak 13 kasus dari 25 kasus sampel penelitian menunjukkan ekspresi Ki67 positif dan 12 kasus (48%) negatif (Gambar 1 c, d). Delapan diantara 16 kasus dengan ulserasi menunjukkan ekspresi Ki67 negatif sedangkan 8 kasus lainnya positif. Hasil uji asosiasi dari variabel ulserasi tumor dan ekspresi Ki67 tidak bermakna ($p > 0,005$).

Pada kelompok MM dengan aktivitas mitosis tinggi didapatkan ekspresi Ki67 positif pada 11 kasus (44%) dan 8 kasus (32%) lainnya negatif. Hasil uji kemaknaan diantara kedua variabel tersebut tidak bermakna ($p = 0,378$).

Ekspresi Ki67 positif terlihat pada 5 kasus (20%) di antara 8 kasus yang disertai keterlibatan KGB. Sebanyak 3 kasus (12%) lainnya menunjukkan ekspresi Ki67 negatif. Hasil uji asosiasi menunjukkan hasil yang tidak bermakna ($p = 0,673$).



Gambar 1. Pewarnaan P16 dan Ki67 pada melanoma nodular. (a). Pulasan p16 dengan Overekspresi p16 pada inti dan sitoplasma (index pewarnaan 2-9). (b). Penurunan ekspresi p16 pada inti dan sitoplasma melanoma malignum kutis jenis nodular (index pewarnaan 0-1). (c). Ekspresi positif Ki67. (d). Ekspresi negatif Ki67 (pembesaran 40x).

DISKUSI

Tujuhbelas dari 25 sampel penelitian menunjukkan ekspresi p16 negatif. Hal tersebut

sejalan dengan penelitian Kostov dkk¹⁸ yang melaporkan terjadinya penurunan ekspresi p16 lebih sering pada kasus melanoma malignum jenis nodular yang berhubungan dengan berbagai keadaan seperti hilangnya fungsi gen p16, keadaan lanjut dari melanoma, dan progresivitas perkembangan tumor. Staume dkk melaporkan 42% dari 202 sampel melanoma dengan pola pertumbuhan vertikal dan mengalami ulserasi, memiliki ekspresi p16 negatif.⁴ Laporan tersebut sejalan dengan penelitian ini yang menunjukkan ekspresi p16 negatif pada 40% sampel dengan ulserasi.

Pada penelitian ini ditunjukkan ekspresi p16 negatif pada 52% sampel dengan aktivitas mitosis tinggi dan 16% sampel dengan aktivitas mitosis rendah. Ekspresi p16 negatif ini mengindikasikan adanya penghambatan fungsi p16 yang menyebabkan terjadinya peningkatan proliferasi sel tumor yang ditandai oleh peningkatan aktivitas mitosis.¹⁷⁻²⁰ Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Talve dkk.¹⁵

Berbagai penelitian MM menggunakan Ki67 sebagai penanda prognostik dengan alasan karena Ki67 tidak terekspresi pada fase istirahat (G0) dalam siklus sel, tetapi mulai terekspresi pada fase pertengahan G1 sampai dengan fase M, sehingga Ki67 dianggap sebagai penanda proliferasi. Pada penelitian ini ekspresi Ki67 tersebar heterogen. Positivitas ekspresi protein Ki67 memiliki kisaran antara 0-80% dengan nilai median 23%.

Hasil penelitian Ki67 yang tidak signifikan pada penelitian ini sejalan dengan penelitian oleh Hazan dkk dan Gimotty dkk²¹⁻²³ yang juga menunjukkan proporsi yang hampir sama antara ekspresi Ki67 rendah dan tinggi pada melanoma yang mengalami ulserasi.

Ekspresi Ki67 yang tidak bermakna pada penelitian ini sejalan dengan penelitian Gimotty dkk, yang mendapatkan 57,4% ekspresi Ki67 positif pada aktivitas mitosis tinggi. Hal ini kemungkinan disebabkan sensitivitas Ki67 yang lebih tinggi dibandingkan dengan penghitungan secara manual pada sel-sel yang mengalami mitosis.

KESIMPULAN

Pada melanoma malignum kulit jenis nodular tidak ditemukannya hubungan antara ekspresi p16 dan Ki67 dengan gambaran ulserasi, aktivitas mitosis, dan metastasis KGB.

DAFTAR PUSTAKA

1. Badan Registrasi Kanker, Perhimpunan Dokter Spesialis Patologi Anatomi-Yayasan Kanker Indonesia. Kanker di Indonesia tahun 2008. Data Histopatologik. Direktorat Jendral Pelayanan Medik Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 2008.
2. Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. *Ochner J.* 2010; 10: 56-65.
3. Li N, Mangini J, Bhawan J. New prognostic factors of cutaneous melanoma : a review of literature. *J Cutan Pathol.* 2002; 29: 324-40.
4. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Can Res.* 2000; 6 : 1845-53.
5. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 2000;60:3689-95.
6. Palmieri G, Capone M, Ascierto MA, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, *et al.* Main road to melanoma. *J Translat Med.* 2009;7:86.
7. Roussel MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999;18: 5311-7.
8. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010; 24: 2463-79.
9. Li N, Mangini J, Bhawan J. New prognostic factors of cutaneous melanoma : a review of literature. *J Cutan Pathol.* 2002; 29: 324-40.
10. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitosis as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 2010; 10: 140.
11. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS, Zhuang L, *et al.* The role of cell cycle regulatory protein in pathogenesis of melanoma. *Pathology.* 2006; 38:287-301.
12. Mc Master KM, Edward MJ, Ross MI, Reintgen DS, Martin RC, Urist MM. Ulceration as a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in melanoma. *Ann Surg.* 2010; 252: 460-6.
13. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. In : Manga P, Hoek KS, Davids LM, Leachman SA, editors. *Dermatology Research and practice. From melanocyte to malignant metastatic melanoma.* Hindawi publishing corporation; 2010
14. Retsas S, Henry K, Mohammed MQ, MacRae K. Prognostic factors of cutaneous melanoma and a new staging system proposed by the American Joint Committee on cancer (AJCC): validation in cohort of 1284 patients. *EJC.* 2002; 38:511-6.
15. Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of p16ink4a/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1997: 255-9.
16. Wang SQ, Setiow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, *et al.* Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol.* 2001; 44: 837-46.
17. Pearl RA, Pacifico , Richman PJ, Stoll DJ, Wilson GD, Grobbelaar AO. Ki67-expression in melanoma. A potential method of risk assessment for the patient with a positive sentinel node. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007;26:109-15.
18. Kostov M, Mijovic Z, Mihailovic D, Cerovic S, Stojanovic M, Jelic M. Correlation of cell cycle regulatory protein (p53 and p16 ink4a) and bcl-2 oncoprotein with mitotic index and thickness of primary cutaneous malignant melanoma. *Bosnian J Bas Med Sci.* 2010; 10: 278-81.
19. Barnhill RL, Katzen J, Spatz A, Fine J, Berwick M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol.* 2005; 32:268-73.
20. Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, *et al.* P16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. *Int J Cancer.* 2005;118:2262-8.
21. Egger ME, Dunki-Jacobs EM, Callender GG, Quillo AR, Scoggins CR, Martin II RCG. Outcomes and prognostic factors in nodular melanoma. *Surgery.* 2012.
22. Hazan C, Melzer K, Panageas K, Li E, Kamino H, Kopf A, *et al.* Evaluation of the proliferation marker MIN-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer.* 2002;95:634-40.

Hubungan antara Ekspresi Protein P16 dan Ki67 dengan Faktor
Riesye Arisanty, Budiana Tanurahardja, Mpu Kanoko

23. Ginnotty PA, VanBelle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, *et al.* Biologic and prognostic significance of dermal Ki67

expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:8048-56.