

# Eksresi Ki-67 dan COX-2 pada Papiloma dan Karsinoma Sel Skuamosa Laring

Vinna Chrisdianti, Willy Sandhika

Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga  
RSUD. Dr. Soetomo, Surabaya

## ABSTRAK

### Latar belakang

Papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa merupakan bentuk neoplasma yang banyak ditemukan pada laring. Infeksi *human papilloma virus* (HPV), terutama tipe 6 dan 11 terbukti berperan dalam terjadinya papiloma sel skuamosa, sedangkan karsinoma sel skuamosa disebabkan oleh bahan-bahan karsinogenik, terutama rokok dan alkohol. Beberapa penelitian telah dikembangkan untuk membantu penegakan diagnosis dengan mengamati ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada lesi-lesi tersebut. Tujuan penelitian ini untuk menganalisis perbedaan dan korelasi ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa.

### Metode

Penelitian ini bersifat observasional analitik dengan pendekatan *cross sectional*. Populasi penelitian adalah blok parafin sediaan papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa yang tersimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD. Dr. Soetomo periode 1 Januari 2012 sampai dengan 31 Maret 2013. Dari masing-masing kasus diambil 15 sampel. Blok parafin yang memenuhi kriteria dilakukan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi Ki-67 dan COX-2 dan dinilai berdasarkan intensitas kualitatif. Perbedaan ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa dianalisis dengan menggunakan uji Spearman.

### Hasil

Limabelas kasus papiloma sel skuamosa menunjukkan rerata usia penderita  $17,27 \pm 9,91$  tahun, dan 15 kasus karsinoma sel skuamosa menunjukkan rerata usia penderita  $58,80 \pm 8,54$  tahun. Analisis statistik ekspresi Ki-67 dan COX-2 antara papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ). Analisis statistik antara ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada papiloma sel skuamosa menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ). Analisis statistik antara ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada karsinoma sel skuamosa menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ( $p > 0,05$ ).

### Kesimpulan

Eksresi Ki-67 dan COX-2 meningkat pada karsinoma sel skuamosa. Ekspresi Ki-67 dan COX-2 antara papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa menunjukkan korelasi.

**Kata kunci** : COX-2, karsinoma sel skuamosa, Ki-67, papiloma sel skuamosa,.

## ABSTRACT

### Background

Squamous cell papilloma and carcinoma are common forms of neoplasm of the larynx. HPV infections, especially type 6 and 11, play a role in the occurrence of squamous papilloma, whereas squamous cell carcinoma caused by carcinogenic materials, especially cigarette and alcohol. Several studies had been developed to assist in the diagnosis by examining the expression of Ki-67 proteins and COX-2 in these lesions. The research was conducted to analyze the differences and correlation of Ki-67 protein and COX-2 expression in squamous cell papilloma and carcinoma.

### Methods

This study was analytic observational with cross sectional design. Population of this study was paraffin blocks of squamous cell papilloma and carcinoma stored in the Anatomical Pathology Laboratory Dr. Soetomo Hospital within the period January 1, 2012 to March 31, 2013. From every case we took 15 sample. The samples used in this study were taken, respectively-each of the 15 cases from all cases were found. Paraffin blocks that met the criteria were stained immunohistochemical method using Ki-67 and COX-2 antibody, and were assessed the qualitative intensity. Differences expression of Ki-67 protein and COX-2 in squamous papilloma and squamous cell carcinoma were analyzed using Spearman tests.

### Results

Fifteens cases of squamous papilloma showed mean of patient age  $17.27 \pm 9.91$  years, and fifteens cases of squamous cell carcinoma patients showed mean of age  $58.80 \pm 8.54$  years. Statistic analyzes of Ki-67 and COX-2 expression between squamous cell papilloma and squamous cell carcinoma showed significant differences ( $p < 0.05$ ). Statistic analyzes of Ki-67 and COX-2 expression in papilloma cell squamous showed no significant differences ( $p > 0.05$ ). Statistic analyzes of Ki-67 and COX-2 expression in squamous cell carcinoma showed no significant differences ( $p > 0.05$ ).

### Conclusion

Expression Ki-67 and COX-2 have been increased in squamous cell carcinoma. Expression Ki-67 and COX-2 between squamous papilloma and squamous cell carcinoma showed correlation.

**Key words** : COX-2, Ki-67, squamous cell carcinoma, squamous cell papilloma.

**PENDAHULUAN**

Karsinoma laring merupakan tumor yang paling banyak dijumpai pada bagian kepala-leher. Karsinoma sel skuamosa (KSS) dan papiloma sel skuamosa (PSS) adalah tumor yang terbanyak pada laring. PSS dan KSS ini berbeda-beda dalam hal distribusi umur dan jenis kelamin, potensi pertumbuhan, tingkat invasi, gambaran morfologi, kecenderungan progresif dan perjalanan klinis. Perbedaan ini dapat mencerminkan jenis dan urutan perubahan genetik yang diperoleh selama proses transformasi.<sup>1,2,3</sup>

Proliferasi sel yang tidak terkendali merupakan salah satu ciri dari neoplasma ganas. Pada KSS terjadi proliferasi sel yang jauh lebih tinggi daripada PSS. Pewarnaan dengan Ki-67 dapat digunakan untuk mengidentifikasi sel. Ekspresi Ki-67 dapat digunakan mendeteksi proliferasi sel baik pada sel normal maupun neoplasma.<sup>2</sup>

Ki-67 adalah antibodi monoklonal yang diekspresikan sepanjang siklus sel (G<sub>1</sub>, S-G<sub>2</sub>, dan M), tetapi tidak ada pada sel diam (G<sub>0</sub>). Indeks proliferasi Ki-67 dapat digunakan sebagai marker yang dapat dipakai untuk membedakan antara PSS dan KSS. Aktivitas proliferasi sel pada lesi jinak dan ganas dapat ditentukan dengan cara menghitung indeks proliferasi Ki-67. Pemeriksaan imunohistokimia Ki-67 merupakan metode yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi proliferasi sel dan menentukan agresivitas tumor. Ki-67 memiliki waktu paruh pendek, maka dapat digunakan sebagai penanda aktif sel berkembang biak. Karena tidak diekspresikan selama fase istirahat dari siklus sel, Ki-67 berfungsi sebagai indikator spesifik proliferasi sel.<sup>4,5</sup>

Munger, dkk (2004), menyebutkan bahwa KSS, sebagaimana halnya merupakan penyakit neoplasma ditandai dengan adanya kelainan proliferasi, telah terjadi pertumbuhan sel yang tidak terkendali. Aktivasi proto-onkogen dan inaktivasi tumor supresor gen merupakan kejadian genetik dan epigenetik yang bertanggung jawab atas terjadinya transformasi neoplasia. Karsinogenesis merupakan proses bertahap yang ditandai dengan adanya serangkaian kejadian genetik dan epigenetik yang mengakibatkan adanya pertumbuhan sel di luar mekanisme kontrol normal, sehingga terjadi proliferasi sel yang berlebih.<sup>5,6</sup>

Enzim COX-2 merupakan produk metabolisme asam arakhidonat yang mengkatalisis

pembentukan prostaglandin, suatu mediator inflamasi. Overekspresi COX-2 dapat ditemukan pada kasus kanker, artinya ekspresi COX-2 dapat digunakan untuk deteksi.<sup>7,8</sup>

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan dan korelasi ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS, menggunakan teknik Imunohistokimia.

**METODE PENELITIAN**

Penelitian ini bersifat observasional analitik dengan desain *cross sectional*, yang dilakukan di Departemen/SMF/Instalasi Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD. Dr. Soetomo dengan menggunakan blok parafin dengan diagnosis papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa mulai 1 Januari 2012-31 Maret 2013. Sediaan hematoksilin dan eosin dinilai ulang dan dari blok parafin yang mengandung cukup sel tumor dibuat sediaan dengan pulasan antibodi monoklonal Ki-67 rabbit klon SP6 (Biocare, USA), serta antibodi poliklonal COX-2 (Biocare, USA).

Ekspresi Ki-67 dinilai secara visual dengan mikroskop cahaya binokular dan dinilai secara kuantitatif (persentase) dihitung berdasarkan jumlah inti sel yang terpulas positif dengan intensitas sedang sampai kuat dalam 100 sel pada area *hot spot*. Sedangkan COX-2 juga dinilai secara kuantitatif (persentase) dihitung berdasarkan sel yang terpulas positif pada sitoplasma sel epitel dengan intensitas sedang sampai kuat dalam 100 sel pada area *hot spot*.

Perbedaan ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS dianalisis menggunakan uji t-dan Mann-Whitney. Korelasi antara ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS dianalisis menggunakan uji Spearman. Analisis statistik menggunakan perangkat lunak *statistical package for the social sciences* (SPSS).

**HASIL**

Selama periode 1 Januari 2012 sampai 31 Maret 2013 didapatkan 15 sampel untuk PSS dan 15 sampel untuk KSS. Data klinikopatologi yang terdapat pada penelitian ini adalah usia dan jenis kelamin. Variabel penelitian yang dinilai adalah ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS.

Pada penelitian ini umur yang paling muda adalah 6 tahun dan yang paling tua 73 tahun, dengan rerata umur penderita pada kasus PSS 17,27 ± 9,91 tahun dan pada kasus KSS 58,80 ± 8,54 tahun. Umur penderita yang paling

banyak didiagnosis seba-gai PSS berada pada rentang <30 tahun. Pada KSS, paling banyak pada rentang 50-59 tahun dapat diketahui bahwa jenis kelamin sampel yang paling banyak adalah laki-laki, sebanyak 25 sampel (83,3%). Pada penelitian ini didapatkan jenis kelamin sampel terbanyak untuk PSS ada-lah laki-laki dengan 11 sampel (73,3%) dan jenis kelamin sampel terbanyak untuk KSS adalah laki-laki dengan 14 sampel (93,3%) (Tabel 1).

Rerata ekspresi Ki-67 pada PSS adalah 35,60±22,47, sedangkan pada KSS adalah 61,60±22,88 (Tabel 2). Nilai *cut off* Ki-67 untuk menjadi KSS adalah sebesar 45%. Adapun hasil analisis dengan *t-test* menunjukkan adanya perbedaan ekspresi Ki-67 antara PSS dan KSS ( $p<0,05$ ).

Rerata ekspresi COX-2 pada PSS adalah 4,67±12,46, sedangkan pada KSS adalah 71,67±19,24 (Tabel 3). Nilai *cut off* COX-2 untuk menjadi KSS adalah sebesar 35%. Analisis Mann-Whitney ekspresi COX-2 antara PSS dan KSS menunjukkan perbedaan bermakna ( $p<0,05$ ).

Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian.

Karakteristik	Jenis tumor		Total
	Papiloma sel skuamosa (n=15)	Karsinoma sel skuamosa (n=15)	
Jenis kelamin			
Laki-laki	11 (73,3%)	14 (93,3%)	25 (83,%)
Perempuan	4 (26,7%)	1 (6,7%)	5 (16,7%)
Umur (tahun)			
$\bar{x} \pm SD$	17,27±9,91	58,80 ±8,54	38,03±22,99
Rentang	5 - 39	44 - 73	5 - 73
≤20	9 (60,0%)	0 (0,0%)	9 (30,0%)
21-40	6 (40,0%)	0 (0,0%)	6 (20,0%)
41-60	0 (0,0%)	9 (60,0%)	9 (30,0%)
>60	0 (0,0%)	6 (40,0%)	6 (20,0%)

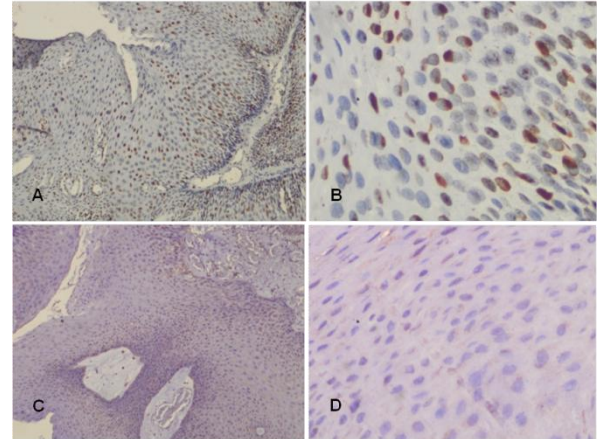
Tabel 2. Ekspresi protein Ki-67 pada papiloma sel skuamosa (PSS) dan karsinoma sel skuamosa (KSS).

Jenis tumor	n	Ekspresi Ki-67 (%)		p
		$\bar{x} \pm SD$	Rentang	
PSS	15	35,60±22,47	2-72	0,004*
KSS	15	61,60±22,88	30-90	

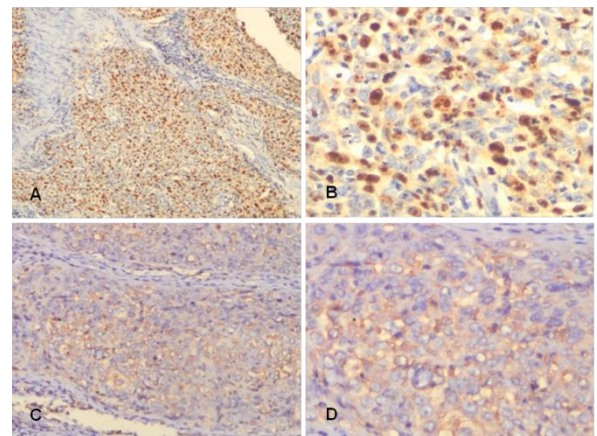
Tabel 3. Ekspresi COX-2 pada papiloma sel skuamosa (PSS) dan karsinoma sel skuamosa (KSS).

Jenis tumor	n	Ekspresi COX-2 (%)			p
		$\bar{x} \pm SD$	Me-dian	Ren-tang	
PSS	15	4,67±12,46	0	0-40	0,000*
KSS	15	71,67±19,24	75	25-90	

Eksresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS ditampilkan pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Papiloma sel skuamosa, IHC Ki-67 persentase 20% (A. 100x, B. 400x), IHC COX-2 negatif (C. 100x, D. 400x).



Gambar 2. Karsinoma sel skuamosa, IHC Ki-67 persentase 90% (A. 100x, B. 400x), IHC COX-2 persentase 80% (C. 100x, D. 400x).

Uji Spearman pada ekspresi Ki-67 dan COX-2 antara PSS dan KSS menunjukkan perbedaan bermakna ( $p>0,05$ ).

**DISKUSI**

Pada penelitian ini didapatkan data penderita PSS dan KSS di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya selama periode 1 Januari 2012-31 Maret 2013 sebanyak 30 kasus, terdiri atas 15 sampel PSS dan 15 sampel KSS.

Pada 15 sampel PSS yang diteliti didapatkan usia penderita bervariasi 5-39 tahun, dan

15 sampel KSS 44-73 tahun. Umur penderita yang paling banyak didiagnosis sebagai PSS berada pada rentang  $\leq 20$  tahun. Pada KSS, paling banyak pada rentang 41-60 tahun. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa rerata usia penderita PSS 5-40 tahun, sedangkan rerata usia penderita KSS 40-60 tahun. Namun, survey *National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Result Cancer Statistic Review* (2012), menyatakan rerata penderita tumor ganas laring 65 tahun.<sup>1-4</sup>

Pada Tabel 3 tampak bahwa penderita laki-laki (73,3%) dan KSS (93,3%). Hal ini sesuai dengan peneliti terdahulu yang menyebutkan bahwa karsinoma laring banyak ditemukan pada pria karena lebih sering menggunakan tembakau dibanding wanita.<sup>1,2,5,6</sup>

Pada penelitian ini, rerata ekspresi Ki-67 pada KSS lebih tinggi dibandingkan pada PSS. Uji analisis *t-test* ekspresi Ki-67 antara PSS dan KSS menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ); dengan nilai *cut off* indeks proliferasi Ki-67 45%; sedangkan rerata ekspresi COX-2 pada KSS lebih tinggi dibanding *t-test* pada PSS. Uji analisis *t-test* ekspresi COX-2 antara PSS dan KSS menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,05$ ), dengan nilai *cut off* 35%.

Penelitian ini membuktikan korelasi ekspresi Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS. Adanya korelasi antara Ki-67 dan COX-2 pada PSS dan KSS dapat disebabkan oleh proses karsinogenesis.

Peneliti sebelumnya mengungkapkan adanya peran NF-kB dalam karsinogenesis. Ekspresi COX-2 dikendalikan oleh faktor transkripsi NF-kB. NF-kB semula diketahui mempunyai fungsi fisiologis sebagai faktor transkripsi sel B untuk mengontrol ekspresi immunoglobulin rantai kappa dan kemudian diketahui juga berperan dalam berbagai reaksi imunologik fisiologis yang lain. Berbagai penelitian membuktikan bahwa di samping sebagai koordinator respons imun, sinyal NF-kB memegang peranan penting dalam pertumbuhan kanker dan perkembangannya. Di lain pihak, NF-kB menginduksi produksi kemokin yang menarik sel imun atau sel inflamatorik tambahan untuk mempertahankan inflamasi terkait tumor. Dalam kaitannya dengan inflamasi, aktivasi NF-kB menghubungkan mekanisme penting antara inflamasi dan kanker dan merupakan faktor utama yang mengendalikan kemampuan sel preneoplastik dan sel ganas

berdasarkan apoptosis serta bertindak sebagai faktor pertumbuhan.<sup>9-11</sup>

Peneliti sebelumnya menyatakan bahwa mekanisme peningkatan karsinogenesis terjadi melalui peningkatan siklus proliferasi sel. Proliferasi sel yang berlebihan akan memicu peningkatan proses desak antar sel. Proses desak antar sel yang meningkat akan memicu pengeluaran fosfolipase A2 dan memacu pengeluaran asam arakhidonat (AA). AA ini dipengaruhi oleh COX-2 akan diubah menjadi prostaglandin yang akan menyebabkan sekresi angiopoitin 2. Hal ini akan menyebabkan aktivasi yang menyebabkan terjadinya progresivitas sel kanker. Proses karsinogenesis menyebabkan terjadinya COX-2 yang meningkat. Peneliti lain menyatakan bahwa peningkatan ekspresi COX-2 akan meningkatkan aktivitas dan sintesis prostaglandin, kemudian akan memicu pengeluaran angiopoitin, CD 44 dan VEGF. Peningkatan ekspresi COX-2 tersebut akan merangsang proliferasi, invasi dan progresivitas tumor.<sup>8,11</sup>

Analisis pada sampel yang berbeda, menunjukkan tidak ada korelasi ekspresi Ki-67 dengan COX-2 pada PSS, dengan hasil analisis Spearman didapatkan  $r_s = 0,502$  dengan nilai  $p = 0,057$  ( $p > 0,05$ ). Demikian juga penelitian ini menunjukkan tidak adanya korelasi ekspresi Ki-67 dengan COX-2 pada KSS, dengan hasil analisis Spearman didapatkan  $r_s = -0,266$  dengan nilai  $p = 0,338$  ( $p > 0,05$ ).

Meskipun pada masing-masing kelompok tidak didapatkan korelasi yang bermakna, akan tetapi apabila kedua kelompok tersebut digabungkan maka didapatkan hubungan yang bermakna. Hal ini menunjukkan perilaku biologi sel (sel epitel jinak dan ganas) merupakan hubungan yang erat dengan proliferasi sel dan proses inflamasi. Pada umumnya diperlukan 2 perubahan penting untuk transformasi keganasan. Pertama, adanya kemampuan untuk tumbuh dan berkembang tanpa stimulasi dari luar (*autocrine*), baik melalui produksi regulator, aktivasi reseptor secara terus menerus atau transduksi sinyal yang abnormal jalur transduksi mulai dari reseptor hingga gen relevan dalam nukleus. Perubahan kedua adalah kesalahan intrinsik dalam komitmen diferensiasi dari sel-sel yang memberikan respon terhadap stimulasi di atas. Karena tidak ada komitmen diferensiasi, yang terbentuk adalah sel-sel yang sama dengan induknya dan bukan sel prognitor yang memiliki komitmen untuk diferensiasi terminal.<sup>15</sup>

**KESIMPULAN**

Ekspresi Ki-67 dan COX-2 meningkat pada KSS. Ekspresi antara Ki-67 dan COX-2 pada papiloma sel skuamosa dan karsinoma sel skuamosa menunjukkan korelasi.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours in Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC; 2005.
2. Federico M, Matteo A, Giuseppe M, Corrado R, Livio P, Massimo R. The Clinical Relevance of Ki-67 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2014.
3. Nix P, Lind M, Greenman J, Stafford N, Cakwkwel L. Expression of cox-2, protein in radioresistant laryngeal cancer. *Ann Oncol.* 2004; 15: 797-801.
4. Papadopoulos O, Betsi E, Tsakistou G, Fangoulis M, Kouvatseas G, Anagnostakis D, *et al.* Expression of cyclin D1 and Ki-67 in skuamosa cell carcinoma of the penis. *Anticancer Res.* 2007; 27: 2167-74.
5. Dornales MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in skin skuamosa cell carcinoma and actinic keratosis. *Ann Bras Dermatol.* 2009; 84: 469-75.
6. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, *et al.* Mechanism of human papillomavirus induced oncogenesis. *J Virol.* 2004; 78: 11451-60.
7. Cho WC. Nasopharyngeal carcinoma: Molecular biomarker discovery and progress. *Mol Cancer* 2007; 6: 1-9.
8. Ogino S, Kirkner GJ, Nosho K, Irahara N, Kure S, Shima K, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 8221-7.
9. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol.* 2010: 1-21.
10. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and Cancer: How Hot is The Link? *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1605-21.
11. Grivennikof SI, Greten FR, Karin M. Immunity. *Immun Inflamm Cancer Cell* 2010; 140: 883-99.
12. Knutsvik G, Stefansson IM, Aziz S, Arnes J, Eide J, *et al.* Evaluation of Ki-67 expression across distinct categories of breast cancer specimens: A population-based study of matched surgical specimens, core needle biopsies and tissue microarrays. *Plos one.* 2014; 9: 1-11.