

Perbandingan Ekspresi p^{16ink4a} antara Pap Smear Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion dengan High Grade Squamous Intraepithelial Lesion

Zakky Sukmajaya¹, Brahmana Askandar T¹, Suhatno¹, Sjahjenny Mustokoweni²

¹Departemen Obstetri dan Ginekologi, ²Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya

ABSTRAK

Kanker serviks sampai saat ini masih merupakan salah satu masalah kesehatan. Protein p^{16ink4a}, merupakan protein supresor tumor yang mencegah pelepasan E2F dari pRb. Pemeriksaan ekspresi p^{16ink4a} pada pap smear dapat dijadikan sebagai alat untuk mengidentifikasi prognosis lesi prakanker. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi p^{16ink4a} antara HSIL dan smear LSIL. Penelitian ini merupakan penelitian obseravasional dengan pendekatan cross sectional di klinik Ginekologi Onkologi dan Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo, Surabaya. Sampel adalah BTA slide dikumpulkan dari penyimpanan Departemen Patologi Anatomi Dr Soetomo, Surabaya 1 Mei 2011 sampai 31 Agustus 2011. Enam belas sampel dikumpulkan secara berurutan untuk setiap kelompok (HSIL, LSIL), sehingga 32 sampel total. Semua sampel diproses imunositokimia menggunakan mouse JC8 anti-manusia monoklonal, (Dako, Glostrup Denmark) dan ekspresi p^{16ink4a} dievaluasi oleh ahli sitopatologi. p^{16ink4a} ekspresi dihitung semi- kuantitatif dengan kriteria Wentzensen. Perbedaan ekspresi p^{16ink4a} antara HSIL dan LSIL dianalisis dengan uji Mann Whitney. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi p^{16ink4a} pada smear LSIL, 68,8% negatif dan 31,2% sebesar 1, skor dari kriteria Wentzensen. Ekspresi p^{16ink4a} di smear HSIL, 62,5% adalah negatif, 6,25% 1 dan 31,5% 2, skor dari kriteria Wentzensen. Perbedaan ekspresi p^{16ink4a} antara HSIL dan smear LSIL tidak signifikan $p = 0,358$ ($p > 0,05$). Dalam kesimpulan, ekspresi p^{16ink4a} lebih tinggi pada smear HSIL (MOG 2011;19:54-62)

Kata kunci: ekspresi p^{16ink4a}, LSIL, HSIL, lesi serviks pra-kanker, Pap smear

ABSTRACT

Cervical cancer is still one of the health problems. Protein p16INK4a is a tumor suppressor protein that prevents the release of E2F of PRB. The examination of the expression of p16INK4a in pap smear can be used as a prognostic tool to identify precancerous lesions. The purpose of this study was to investigate the differentiation of p^{16ink4a} expression between HSIL and LSIL smear. This was an observational study with cross sectional approach in Gynecology Oncology Clinic and Pathology Anatomy Department of Dr Soetomo General Hospital, Surabaya. The samples were smear slides collected from storage of Pathology Anatomy Departement of Dr. Soetomo General Hospital, from Mei 1st, 2011 to August 31st, 2011. Sixteen samples were collected consecutively for each group (HSIL,LSIL), thus 32 samples totally. All samples were processed by immunocytochemistry using monoclonal mouse anti-human JC8, by Dako, Glostrup Denmark and p^{16ink4a} expression were evaluated by citopatologist. p^{16ink4a} expression were counted semiquantitatively with Wentzensen criteria. The differentiation of p^{16ink4a} expression between HSIL and LSIL was analysed by Mann Whitney test. Results showed that the p^{16ink4a} expression in LSIL smear; 68.8% were negative and 31.2% were 1, score from Wentzensen criteria. The p^{16ink4a} expression in HSIL smear; 62.5% were negative, 6.25% were 1 and 31.5% were 2, score from Wentzensen criteria. The differentiation of p^{16ink4a} expression between HSIL and LSIL smear were not significant $p=0.358$ ($p>0.05$). In conclusion, p^{16ink4a} expression is higher in HSIL smear (MOG 2011;19:54-62)

Keywords: p^{16ink4a} expression, LSIL, HSIL, precancerous cervical lesion, Pap smear

Correspondence: Zakky Sukmajaya, Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, jay_obgyn@yahoo.com

PENDAHULUAN

Kanker serviks sampai saat ini masih merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar didunia meskipun dengan program skrining yang telah dipergunakan secara luas hingga sekarang telah mampu menurunkan insiden dan kematian yang diakibatkan oleh penyakit tersebut. Sejak George Papanicolaou memperkenalkan pap smear pada tahun 1941, pemeriksaan ini masih tetap berdasarkan pada interpretasi morfologi sel yang

diambil dari permukaan serviks.⁵ Sehingga secara internasional pemeriksaan papsmear ini hanya memiliki sensitifitas berkisar 50%-60% dan juga program skrining ini baru bisa berhasil dengan baik bila dilakukan pemeriksaan berulang.¹⁶ Sedangkan *The Bethesda system* didesain untuk mengkorelasikan temuan sitologi dan histologi, dan menyiapkan sebuah standard internasional yang diharapkan bisa mengurangi tingginya *false positive* pada pembacaan Pap smear. LSIL meliputi Papanicolaou klas III, *mild dysplasia*,

CIN I dan infeksi *human papillomavirus* (HPV). HSIL meliputi Papanicolaou kelas III dan IV, moderate dysplasia, severe dysplasia, CIS, CIN 2 dan CIN 3.¹

Infeksi HPV sampai saat ini dianggap sebagai faktor inisiator kanker serviks karena pada banyak penelitian baik secara epidemiologis maupun laboratoris telah menemukan DNA HPV pada 95% sampai 100% kasus kanker serviks.² Padahal sejumlah literatur menyebutkan bahwa hanya 30-40% dari penderita yang terkena infeksi *High Risk Papillomavirus* (HR HPV) yang akan berkembang menjadi kanker serviks.^{7,5,13} Proses yang mengarah pada transformasi dimulai adanya integrasi DNA HPV dengan genom sel tubuh. Onkoprotein E6 akan menginaktivasi *Tumor Suppressor Gene* (TSG) p53 yang akan mengakibatkan p53 kehilangan fungsinya. Sedangkan onkoprotein E7 akan menginaktivasi TSG protein Retinoblastoma (pRb) sehingga E2F akan terlepas dari pRb.¹⁰ Pemeriksaan DNA HPV dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *Direct Hybridization* dan *Hybrid Capture 2* (HC2) memiliki sensitivitas rata-rata >90% bila dilakukan pada wanita usia > 30 tahun, sedangkan spesifisitasnya menurun pada wanita usia < 30 tahun karena tingginya prevalensi wanita yang terinfeksi HPV pada usia tersebut. Pemeriksaan ini mahal dan tidak bisa menggambarkan aktifitas infeksi HPV dan seberapa jauh integrasinya dengan genom sel tubuh.¹⁶

Wentzensen et.al melaporkan bahwa hasil *cone biopsy* yang dilakukan pada kasus LSIL, sebesar 23-28% dari kasus tersebut ternyata tidak didapatkan perubahan secara histologis, sehingga 12-51% *cone biopsy* telah dilakukan berdasarkan hasil pap smear yang *false positive*.¹⁶ Metaplasia dan perubahan reaktif yang tidak terkait infeksi HPV serta beberapa temuan histologi lain yang juga bisa memberikan gambaran LSIL antara lain: skuamous metaplasia, hiperplasia sel basal, hiperplasia mikroglanduler, dan inflamasi.¹¹

Protein p^{16ink4a}, merupakan protein supresor tumor yang mencegah pelepasan E2F dari pRb dengan menghambat kerja kompleks cyclin D1-cdk4 dan cdk6 dalam memfosforilasi pRb. Akumulasi E2F yang terlepas dari pRb akan menginduksi aktifitas p^{16ink4a} dan menyebabkan overekspresi p^{16ink4a}.^{9,14} Branca et al. dan Ozgul et al. melaporkan bahwa ekspresi p^{16ink4a} berhubungan secara langsung dengan peningkatan derajat displasia.

Pemeriksaan ekspresi p^{16ink4a} pada pap smear dapat dijadikan sebagai alat untuk mengidentifikasi prognosis lesi prakanker menjadi kanker serviks serta sebagai gambaran seberapa jauh DNA HPV telah berintegrasi dengan DNA sel host. Pemeriksaan ekspresi p^{16ink4a} diharapkan bisa menurunkan false negative, *false*

positive dan meningkatkan akurasi diagnosis pemeriksaan pap smear sehingga bisa mencegah tindakan pembedahan yang tidak perlu.^{3,11,12} Penelitian ini mengkaji apakah ekspresi p^{16ink4a} dari sediaan pap smear HSIL lebih tinggi dari LSIL, dengan tujuan untuk mengetahui perbandingan ekspresi p^{16ink4a} antara pap smear LSIL dengan HSIL.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan suatu double blind cross sectional study, sehingga peneliti dan petugas PA yang melakukan pelunturan dan pewarnaan sama-sama tidak mengetahui diagnosa dari sediaan yang diperiksa. Penelitian dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo Surabaya. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2011 – Selesai. Populasi penelitian adalah seluruh pap smear LSIL dan HSIL. Subyek penelitian diambil dari bahan pap smear yang disimpan di laboratorium PA yang sudah dibaca dengan hasil LSIL dan HSIL dengan persetujuan Direktur RSUD Dr Soetomo c.q Kepala Departemen Patologi Anatomi untuk selanjutnya dilakukan pelunturan warna dan kemudian diberi pewarnaan baru dengan imunositokimia p16 dengan antibody monoclonal JC8. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah adanya sediaan LSIL, sediaan HSIL dan sediaan yang layak baca, sedangkan kriteria eksklusi adalah sediaan yang tidak layak baca. Sampel minimal yang didapat adalah (n)=15,5 ~ 16

Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan menelusuri data laporan hasil pemeriksaan pap smear dengan hasil LSIL dan HSIL di laboratorium Patologi Anatomi, kemudian sediaan tersebut dicari di tempat penyimpanan, dilakukan penilaian ulang oleh citopatologist untuk melihat kelayakannya dan diambil 32 sediaan yang layak baca sesuai dengan jumlah sampel yang dibutuhkan. Seluruh sediaan yang layak baca kemudian dilakukan proses pelunturan warna yang lama dan kemudian dilakukan pewarnaan dengan imunositokimia dan selanjutnya dinilai ekspresi p^{16ink4a}nya. Rancangan penelitian ini double blind, sehingga peneliti dan petugas PA yang melakukan pelunturan dan pewarnaan sama-sama tidak mengetahui diagnosa dari sediaan yang diperiksa. Periode pengambilan sampel penelitian dilakukan pada bulan Mei 2011 s/d Juli 2011. Pemeriksaan dilakukan dengan diawali prosedur pelunturan, dimana sediaan pap smear dilunturkan pewarnaannya dengan direndam dalam acid alkohol 1% selama 30 menit, kemudian dibilas dengan aquades. Slide didinginkan selama 20 menit. Kemudian dilakukan prosedur pewarnaan dan diakhiri dengan pengamatan di bawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr Soetomo sejak bulan Mei 2011 sampai dengan Juli 2011 dan telah dilakukan pelunturan dan pewarnaan terhadap 32 sampel pap smear dengan perincian 16 sampel LSIL dan 16 sampel HSIL. Pengambilan sampel penelitian dilakukan dengan menelusuri data laporan hasil pemeriksaan pap smear dengan hasil LSIL dan HSIL di laboratorium Patologi Anatomi, kemudian sediaan tersebut dicari di tempat penyimpanan, dilakukan penilaian ulang oleh citopatologist untuk melihat kelayakannya dan diambil 32 sediaan yang layak baca sesuai dengan jumlah sampel yang dibutuhkan.

Karena tujuan penelitian ini adalah melihat perbandingan ekspresi p^{16ink4a} pada sediaan pap smear LSIL dan HSIL maka cara pengambilan sampel berdasarkan penarikan tidak berdasar peluang (non-probability sampling) yang paling mendekati probability sampling yakni dengan consecutive sampling yang artinya ketika jumlah sampel untuk masing-masing kategori dianggap cukup maka pengambilan sampel telah terpenuhi. Pembagian merata jumlah sampel ke masing-masing kategori merupakan pilihan peneliti sesuai dengan jumlah terkecil untuk masing-masing katogori yakni 16 sampel. Maksud pemerataan sampel agar didapatkan proporsi yang sama serta saat perhitungan statistik akan jelas terlihat perbedaan ekspresi p^{16ink4a}. Tingkat kemaknaan yang digunakan, adalah 0,05. Dikatakan terdapat perbedaan yang bermakna bila hasil uji statistik $p = 0.05$ dan tidak bermakna bila $p = 0.05$.

Setelah sediaan pap smear terkumpul dilakukan pelunturan warna terhadap semua sediaan tersebut dengan merendam sediaan tersebut dalam larutan acid alcohol 3% selama 24 jam untuk menghilangkan pewarnaan lama yang telah digunakan sebelumnya. Kemudian dilakukan pengecatan imunositokimia secara buta (blind) dimana pemeriksa tidak mengetahui hasil pap smear sebelumnya dengan mengikuti prosedur rutin pengecatan imunositokimia di seksi Imunositokimia Bagian/SMF Patologi Anatomi. Antibodi primer p16 yang digunakan adalah human antibody monoclonal JC8 yang diproduksi oleh DAKO, Glostrup, Denmark. Penilaian ekspresi p^{16ink4a} dilakukan oleh citopatologist dengan melihat perubahan dan intensitas warna coklat pada nukleus maupun sitoplasma dengan menggunakan pembesaran 200x. Ekspresi p^{16ink4a} dinilai secara semikuantitatif berdasarkan kriteria yang diperkenalkan oleh Wentzensen dengan memberikan skor 0 untuk yang negatif dan skor 1-4 untuk yang positif sesuai dengan intensitas perubahan warna coklat dan rasio nukleus/sitoplasma.

Hasil yang didapat ditabulasikan seperti pada tabel 5.1 dan digambarkan pada gambar 5.1. Pada pap smear LSIL didapatkan ekspresi p^{16ink4a} yang negatif /skor 0 sebanyak 11 sampel (68.8%), peningkatan ekspresi dengan skor 1 sebanyak 5 sampel (31.2%), dan tidak didapatkan peningkatan ekspresi p^{16ink4a} sampai dengan skor 2,3 dan 4 dari total 16 sampel yang diperiksa.

Sedangkan pada pap smear HSIL didapatkan ekspresi p^{16ink4a} yang negatif/skor 0 sebanyak 10 sampel (62.5%), peningkatan ekspresi dengan skor 1 sebanyak 1 sampel (6.25%) dan skor 2 sebanyak 5 sampel (31.5%), namun tidak didapatkan peningkatan ekspresi p^{16ink4a} sampai dengan skor 3 dan 4 dari total 16 sampel HSIL yang diperiksa.

Untuk hasil yang positif, pada kelompok LSIL hanya mencapai skor 1 sedangkan pada kelompok HSIL sebagian besar mencapai skor 2. Meskipun dari hasil pemeriksaan yang didapat menunjukkan bahwa skor ekspresi p^{16ink4a} pada sediaan pap smear HSIL lebih tinggi daripada LSIL namun analisis statistik dengan menggunakan uji Mann-Whitney ternyata tidak berbeda secara bermakna (harga $p = 0,358$).

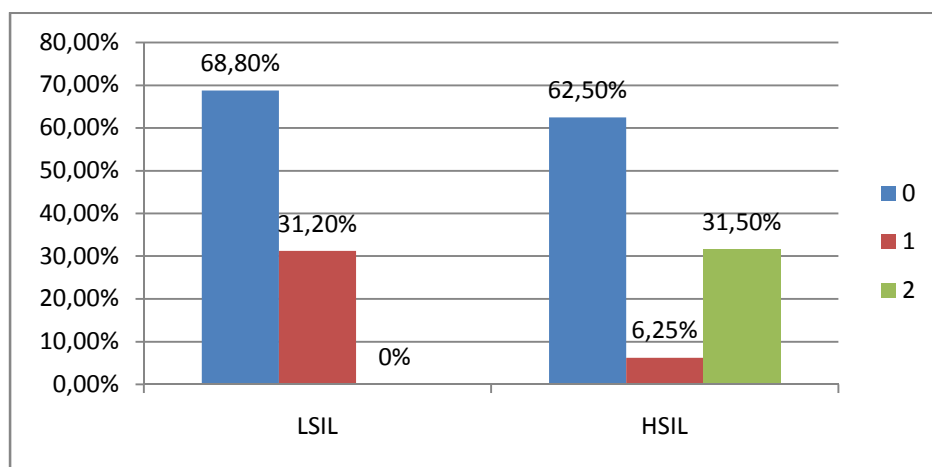
Gambaran yang dihasilkan dari prosedur pewarnaan imunositokimia p^{16ink4a} ini dapat dilihat pada gambar 5.2 - 5.8. Pemberian counterstain Hematoxilin Eosin pada pewarnaan ini bertujuan agar morfologi sel epitel tetap dapat dilihat seperti pada pewarnaan Papanicolaou. Adapun gambaran integrasi antara DNA HR HPV dengan DNA sel host dapat dinilai dengan melihat ekspresi p^{16ink4a} yang terjadi akibat reaksi antara antibodi primer JC8 dengan cromogen DAB berupa intensitas warna coklat pada sitoplasma maupun nukleus.

Kanker serviks sampai saat ini masih merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar didunia meskipun dengan program skrining yang telah dipergunakan secara luas hingga sekarang telah mampu menurunkan insiden dan kematian yang diakibatkan oleh penyakit tersebut. Sejak George Papanicolaou memperkenalkan pap smear pada tahun 1941, pemeriksaan ini masih tetap berdasarkan pada interpretasi morfologi sel yang diambil dari permukaan serviks.⁵ Infeksi HPV sampai saat ini dianggap sebagai faktor inisiator kanker serviks karena pada banyak penelitian baik secara epidemiologis maupun laboratoris telah menemukan DNA HPV pada 95% sampai 100% kasus kanker serviks.² Padahal sejumlah literatur menyebutkan bahwa hanya 30-40% dari penderita yang terkena infeksi HR HPV yang akan berkembang menjadi kanker serviks.^{7,5,13} Sel-sel virus yang sedang replikasi memberikan gambaran perubahan sitologi yang sesuai dengan LSIL. Perubahan yang dimaksud adalah

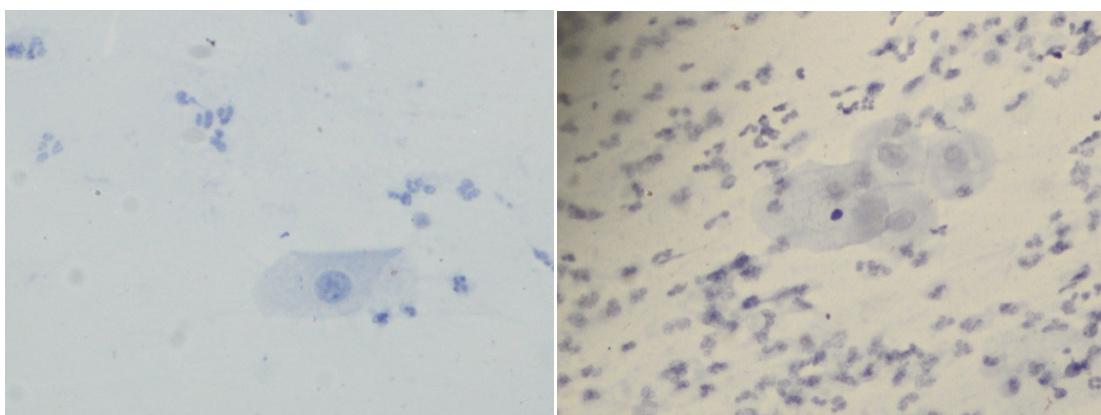
gambaran koilositosis berupa vakuola-vakuola dan juga perubahan kecil morfologi nukleus.

Tabel 1. Ekspresi p^{16ink4a} antara LSIL dan HSIL

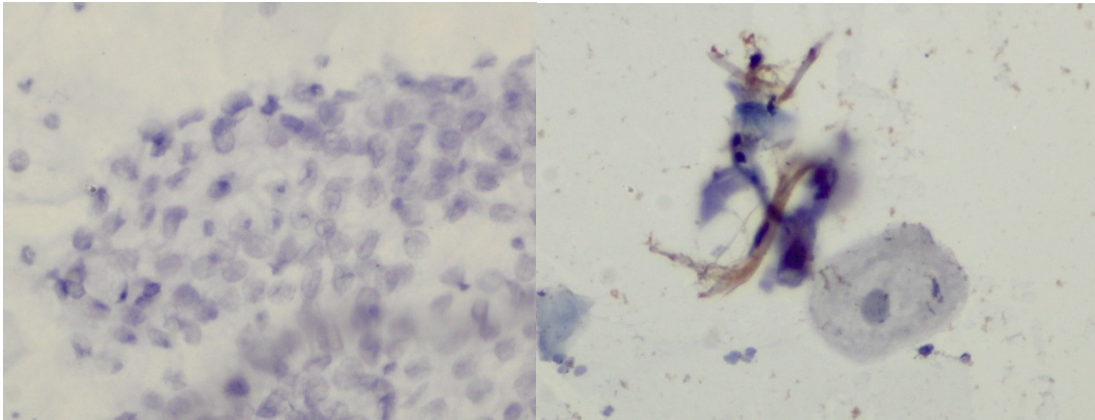
	Ekspresi P ^{16ink4a}					Total
	Negatif Skor 0	Skor 1	Skor 2	Positif Skor 3	Skor 4	
LSIL	11	5	0	0	0	16
HSIL	10	1	5	0	0	16
Total	21	6	5	0	0	32



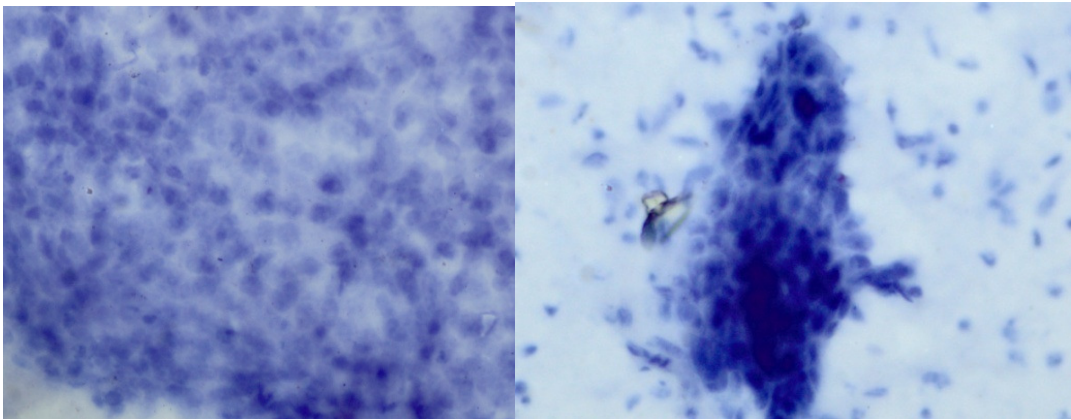
Gambar 1. Perbedaan ekspresi p^{16ink4a} antara pap smear LSIL dan HSIL



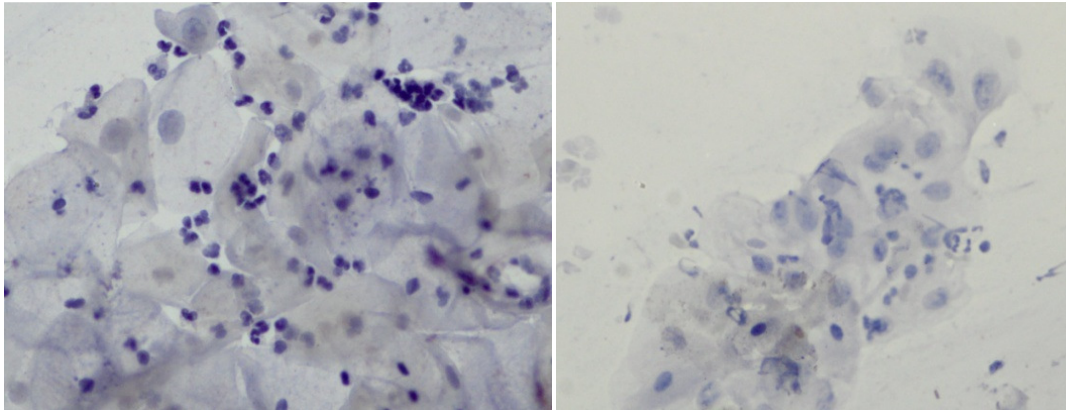
Gambar 2. Sediaan LSIL HPV (-) dengan skor 0



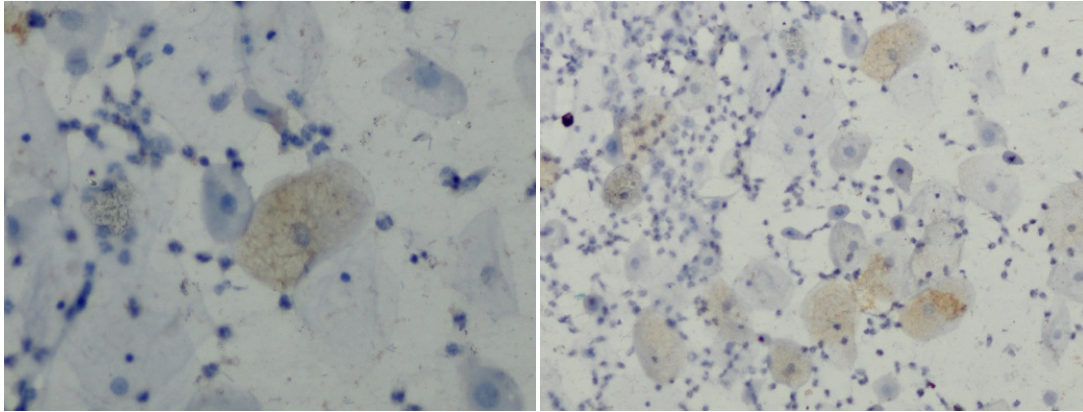
Gambar 3. Sediaan LSIL HPV (+) dengan skor 0



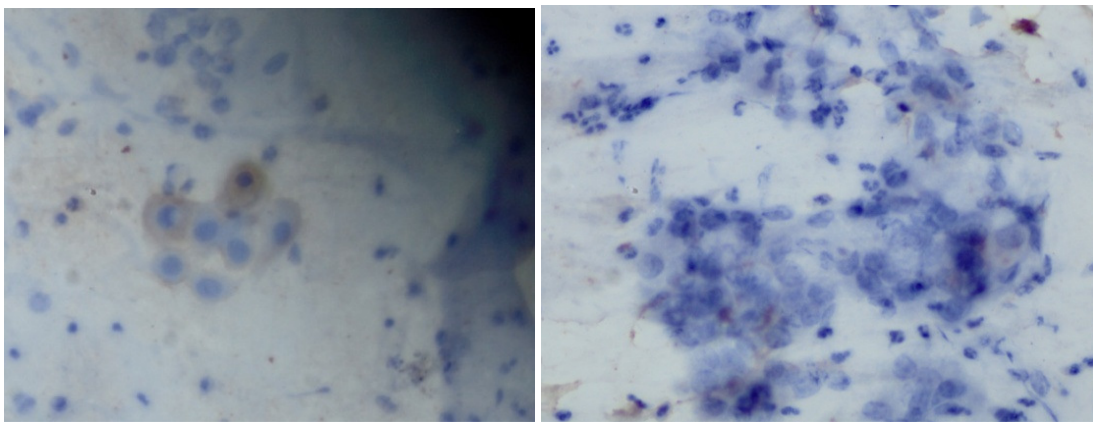
Gambar 4. Sediaan HSIL dengan skor 0



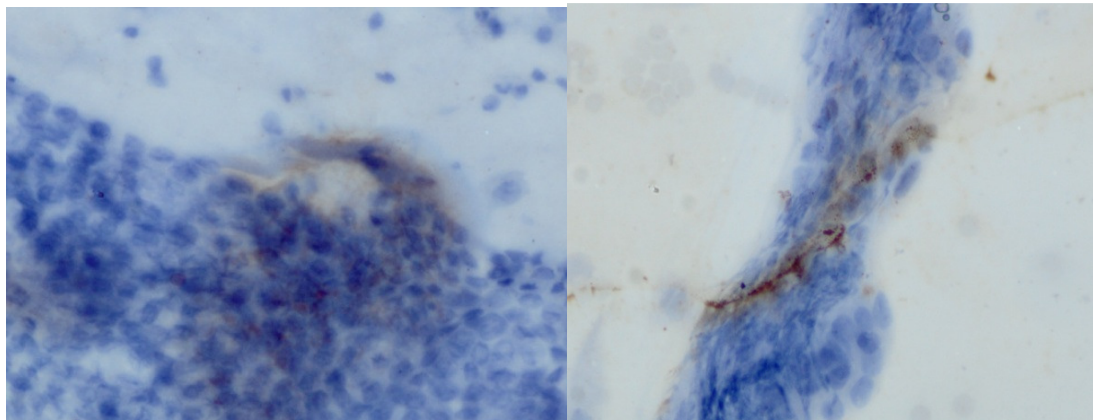
Gambar 5. Sediaan LSIL HPV (-) dengan skor 1



Gambar 6. Sediaan LSIL HPV (+) dengan skor 1



Gambar 7. Sediaan HSIL dengan skor 1



Gambar 8. Sediaan HSIL dengan skor 2

Gambaran pada infeksi akut ini akan sangat berbeda dengan yang terjadi pada infeksi persisten HR HPV, yang ditandai dengan lebih banyak perubahan morfologi yang terjadi, berupa; peningkatan intensitas warna nukleus, aneuploidy, perubahan tekstur kromatin, membran nukleus, ukuran nukleus dan rasio volume

sitoplasma dengan nukleus.⁵ Proses yang mengarah pada transformasi dimulai adanya integrasi DNA HPV dengan genom sel tubuh. Onkoprotein E6 akan menginaktivasi p53 yang akan mengakibatkan p53 kehilangan fungsinya. Sedangkan onkoprotein E7 akan

menginaktivasi pRb sehingga E2F akan terlepas dari pRb.¹⁰

Infeksi HPV terdeteksi pada 99,7% kanker serviks, sehingga infeksi HPV merupakan infeksi yang sangat penting pada perjalanan kanker serviks. Pada penelitian case control, prevalensi infeksi HPV pada kanker serviks jenis karsinoma sel skuamosa dijumpai sejumlah 78,4-98,1%. Selain infeksi yang simpel, interaksi partikel HPV dengan sel host yang spesifik juga dibutuhkan untuk proses inisiasi dan perkembangan HPV sehingga menyebabkan terjadinya displasia. Virus ini akan menginfeksi sel stem epitel ditempat yang secara struktur dan anatomis mudah dimasuki, yaitu di squamous columnar junction pada zona transformasi. Virus ini akan memanfaatkan mesin replikasi DNA sel host untuk mereplikasi episomal genomnya.⁵ Integrasi DNA HPV dengan genom sel tubuh merupakan awal dari proses yang mengarah transformasi. Protein p^{16ink4a}, merupakan protein supresor tumor yang menghambat kerja kompleks cyclin D1-cdk4 dan cdk6 dalam memfosforilasi pRb, sehingga pRb akan terlepas dari ikatan pRb-E2F. Akumulasi dari E2F akan menginduksi aktifitas dari p^{16ink4a}. Overekspresi dari p^{16ink4a} yang terjadi pada kanker serviks sebagai hasil dari inaktivasi fungsional pRb oleh protein E7 HPV. Banyak penelitian menunjukkan hubungan linear antara ekspresi p^{16ink4a} dengan derajat displasia.^{9,14} Wanita dengan infeksi HPV persisten pada mukosa serviksnya akan memiliki resiko berkembang menjadi HSIL 100 kali lebih besar jika dibandingkan dengan yang tidak terinfeksi. Oleh karena itu DNA HR HPV hampir selalu terdeteksi pada seluruh kasus lesi prakanker baik HSIL maupun LSIL dan kanker serviks.^{13,5}

Pada penelitian kami, dari 16 sampel pap smear LSIL yang diperiksa, didapatkan sebagian besar sampel tidak memberikan ekspresi p^{16ink4a} / skor 0 yakni sebanyak 11 sampel (68.8%), sedangkan peningkatan ekspresi p^{16ink4a} hanya mencapai skor 1 yakni sebanyak 5 sampel (31.2%). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Tan et al. yang menyebutkan bahwa 73.3% kasus CIN I menunjukkan hasil p^{16ink4a} negatif yang mungkin disebabkan oleh infeksi laten maupun subklinis HPV dengan viral load yang rendah yang tidak cukup untuk menimbulkan ekspresi p^{16ink4a}. Selain itu juga menguatkan dugaan bahwa metaplasia dan perubahan reaktif yang tidak terkait dengan infeksi HPV juga bisa memberikan gambaran LSIL atau CIN I. Beberapa temuan histologi yang juga bisa memberikan gambaran LSIL antara lain: skuamosus metaplasia, hiperplasia sel basal, hiperplasia mikroglanduler, dan inflamasi.¹¹ Selain itu infeksi Low Risk Papillomavirus (LR HPV) juga bisa menyebabkan perubahan sitologi LSIL tetapi tidak menyebabkan peningkatan dari

ekspresi p^{16ink4a}, karena afinitas protein E7 dari LR HPV 10 kali lebih rendah dari protein E7 dari HR HPV.^{11,4,14}

Nieh et al menyebutkan bahwa pada kasus LSIL yang tidak disebabkan oleh infeksi HPV tidak akan menyebabkan peningkatan ekspresi p^{16ink4a}. Doeberitz et al mendapatkan hasil 40% kasus LSIL tidak mengalami peningkatan ekspresi p^{16ink4a} meskipun didapatkan infeksi HR HPV dan memberikan gambaran koilositosis. Nieh et al. juga melaporkan bahwa pada sebagian besar LSIL hanya positif lemah dan pada sebagian besar HSIL adalah positif kuat. Negri et.al juga melaporkan bahwa penderita LSIL dengan p^{16ink4a} yang diffuse akan lebih banyak berkembang menjadi HSIL sedangkan yang negatif lebih banyak regresi pada follow up. Hariri dan Oster melaporkan negatif predictive value (NPV) dari p^{16ink4a} sebesar 96%. Ekspresi p^{16ink4a} berhubungan secara langsung dengan peningkatan derajat displasia.⁸

Sedangkan pada pap smear HSIL didapatkan ekspresi p^{16ink4a} yang negatif/skor 0 sebanyak 10 sampel (62.5%), peningkatan ekspresi dengan skor 1 sebanyak 1 sampel (6.25%) dan skor 2 sebanyak 5 sampel (31.5%). Tan et al. menyebutkan bahwa yang mungkin bisa menjelaskan penyebab ekspresi p^{16ink4a} negatif pada kasus HSIL adalah adanya methilasi pada lokus 9p21 promoter p^{16ink4a} yang bisa mengganggu aktivitas gen p^{16ink4a} dalam mengikat cdk4/6 sehingga gagal menginduksi siklus sel tetap berhenti pada fase G1 akan tetapi tidak meningkatkan ekspresi p^{16ink4a}, hal ini bisa terjadi pada 15% kasus tumor.^{14,15} Selain itu, sensitifitas pemeriksaan papsmear hanya berkisar 50%-60% seperti yang dikemukakan oleh Wentzensen et.al. yang juga mendapatkan hasil dari *cone biopsy* yang dilakukan pada kasus LSIL, ternyata sebesar 23-28% dari kasus tersebut yang secara histologis tidak didapatkan perubahan, sehingga menarik kesimpulan bahwa selama ini 12-51% *cone biopsy* telah dilakukan berdasarkan hasil pap smear yang *false positive*.¹⁶

Selain itu banyak penelitian cross sectional yang menyebutkan bahwa prevalensi tertinggi infeksi HR HPV ditemukan pada wanita usia muda pada usia rata-rata 20-35 tahun, yakni sebesar lebih dari 30%. Namun prevalensi ini akan menurun sesuai dengan bertambahnya usia, hal ini diduga karena pada kebanyakan wanita infeksi ini akan sembuh dengan sendirinya dan tanpa meninggalkan kelainan patologis. Pada penelitian longitudinal cohort disebutkan bahwa periode akut dari infeksi ini adalah berkisar 8-10 bulan. Dan hanya sedikit dari infeksi tersebut yang persisten dan menyebabkan displasia pada epitel serviks.^{7,5,13,6}

Untuk hasil yang positif, pada kelompok LSIL hanya mencapai skor 1 sedangkan pada kelompok HSIL sebagian besar mencapai skor 2. Meskipun dari hasil

pemeriksaan yang didapat menunjukkan bahwa skor ekspresi p^{16ink4a} pada sediaan pap smear HSIL lebih tinggi daripada LSIL namun hasil analisis statistik dengan menggunakan uji Mann-Whitney ternyata tidak berbeda secara bermakna (harga p = 0,358). Hal ini disebabkan tingginya hasil negatif yang kami dapatkan pada kedua kelompok. yang bisa disebabkan karena sampel yang kami periksa berasal dari penderita yang sedang mengalami regresi spontan karena kebanyakan infeksi HPV bersifat sementara karena respon imun dari sel host akan mengeliminasi secara cepat virus ini sehingga gambaran sitologi yang didapatkan adalah perubahan morfologi sel yang diakibatkan oleh infeksi HPV yang telah terjadi sebelumnya, sedangkan infeksi HPVnya sendiri telah tereliminasi oleh kekebalan tubuh penderita seperti yang telah disebutkan diatas. Carozzi yang menilai akurasi p^{16ink4a} dan test HR HPV dalam memprediksi prognosis ASCUS dan LSIL pada sampel papsmear kemudian dibandingkan dengan hasil biopsinya mendapatkan peningkatan ekspresi p^{16ink4a} yang signifikan pada kelompok LSIL yang berkembang menjadi HSIL dibandingkan dengan kelompok yang tidak berkembang.^{3,8}

Meskipun secara epidemiologi dikatakan secara jelas bahwa infeksi HPV merupakan hal yang penting pada kejadian kanker serviks namun tidak serta merta dengan adanya infeksi HPV akan berkembang menjadi kanker serviks. Selain itu banyak penelitian cross sectional yang menyebutkan bahwa prevalensi tertinggi infeksi HR HPV ditemukan pada wanita usia muda pada usia rata-rata 20-35 tahun, yakni sebesar lebih dari 30%. Namun prevalensi ini akan menurun sesuai dengan bertambahnya usia, hal ini diduga karena pada kebanyakan wanita infeksi ini akan sembuh dengan sendirinya dan tanpa meninggalkan kelainan patologis. Pada penelitian longitudinal cohort disebutkan bahwa periode akut dari infeksi ini adalah berkisar 8-10 bulan. Dan hanya sedikit dari infeksi tersebut yang persisten dan menyebabkan displasia pada epitel serviks.^{7,5,13,6}

Jadi, meskipun secara epidemiologi dikatakan secara jelas bahwa infeksi HPV merupakan hal yang penting pada kejadian kanker serviks namun tidak serta merta dengan adanya infeksi HPV akan berkembang menjadi kanker serviks. Untuk itu diperlukan suatu pemeriksaan yang mempunyai PPV yang lebih baik untuk menilai dysplasia serviks maupun kanker serviks. Sebuah pemeriksaan yang secara dramatis akan menurunkan biaya program skrining yang sudah ada dan akan meningkatkan kepatuhan penderita karena mendapatkan terapi yang tepat dengan segera. Pemeriksaan yang optimal diharapkan hanya bisa mengidentifikasi perubahan dysplasia sel serviks yang sebenarnya, sehingga memiliki PPV dan NPV yang tinggi, serta *false positive* yang rendah.⁵

Pemeriksaan DNA HPV dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Direct Hybridization dan Hybrid Capture 2 (HC2) memiliki sensitifitas rata-rata >90% bila dilakukan pada wanita usia >30 tahun, sedangkan spesifisitasnya menurun pada wanita usia <30 tahun karena tingginya prevalensi wanita yang terinfeksi HPV pada usia tersebut. Pemeriksaan ini mahal dan tidak bisa menggambarkan aktifitas infeksi HPV dan seberapa jauh integrasinya dengan genom sel tubuh.^{16,12}

Guo et.al menyebutkan bahwa pemeriksaan imunositokimia p^{16ink4a} memiliki PPV yang lebih baik dibandingkan dengan pemeriksaan Hybrid Capture II dalam menemukan CIN 2/3 pada sampel LSIL dan sangat berpotensi digunakan untuk seleksi wanita dengan sitologi LSIL untuk dilakukan kolposkopi.⁷ Michelow et al. melaporkan pada kasus pap smear ASC-H yang terbukti negatif secara histologi menyebutkan bahwa pemeriksaan p^{16ink4a} memiliki sensitivitas sebesar 100%, spesifisitas 86%, PPV 91% dan NPV 100%.⁸

Dengan melihat gambaran morfologi pada sediaan yang kami dapatkan pada penelitian ini kami berpendapat bahwa pewarnaan imunositokimia ini bisa meningkatkan akurasi hasil pemeriksaan konvensional yang telah ada karena pewarnaan ini tidak mengubah struktur morfologi dari sel epitel yang dilakukan pemeriksaan, sehingga kita masih bisa menilai rasio nukleus: sitoplasma untuk menentukan derajat lesi seperti pada pewarnaan konvensional. Sedangkan penilaian ekspresi p^{16ink4a} dengan melihat intensitas warna coklat yang dihasilkan oleh pewarnaan ini merupakan penilaian sederhana yang bisa mengurangi kesalahan inter dan intraobserver yang sering terjadi pada pemeriksaan pap smear konvensional selama ini. Pemeriksaan ini murah dan bisa digunakan untuk memeriksa ada tidaknya infeksi HR HPV, serta bisa menilai integrasi DNA HPV terhadap sel host hanya dengan satu kali pemeriksaan. Sehingga dari segi biaya pemeriksaan ini akan lebih murah, dari segi waktu akan lebih pendek dan dari segi manfaat pemeriksaan ini jauh lebih bermanfaat karena selain bisa menentukan derajat lesi, juga bisa menentukan positifitas infeksi HR HPV, derajat integrasi dan selanjutnya bisa menentukan prognosa sehingga akan lebih bermanfaat untuk pemilihan terapi yang tepat bagi penderita.

Sebagai ilustrasi, biaya yang diperlukan untuk pemeriksaan ini adalah: pembelian antibodi primer JC8 sebesar Rp. 5,5 juta yang bisa digunakan untuk 150 kali pemeriksaan, kemudian prosedur pewarnaan imunositokimia sebesar Rp. 150 ribu per sediaan, sehingga bila dilakukan untuk pemeriksaan skrining massal diperlukan biaya Rp.186.666,7,- per sediaan yang bila dibulat-

kan menjadi Rp. 187.000,- per sediaan. Untuk mendapatkan gambaran morfologi yang lebih baik bisa digunakan pada preparat Thin prep maupun Liquid based slide.

KESIMPULAN

Ekspresi p^{16ink4a} pada sediaan pap smear HSIL lebih tinggi daripada LSIL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abeloff. Clinical oncology, 3rd ed, www.elsevier.com. 2007
2. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. P^{16ink4a} expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol*; 2003. 16(7):665-673.
3. Carozzi F. Combined Analysis of HPV DNA and p^{16ink4a} Expression to Predict Prognosis in ASCUS and LSIL Pap Smears. *Coll. Antropol.* 2007. 31 Suppl.2: 103-106
4. DelPino M, Garcia S, FusteV, et al. Value of p^{16ink4a} as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *Am J Obstet Gynecol*;2009. 201:488.e1-7
5. Doeberitz M. Review. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*;2002. 38:2229-2242
6. Garner E. Cervical Cancer: Disparities in Screening, Treatment, and Survival. *Cancer Epidemiol*; 2003.12 Supl March:242s-247s.
7. Lytwyn A, et al. Comparison of *human papillomavirus* DNA testing and repeat Papanicolaou test in women with low grade cervical cytologic abnormalities:a randomized trial. *CMAJ*;2000.163(6):701-7
8. Michelow P, Naidoo C, Omar T, Wanblad C, Njoli A, Dubb M. The use of p^{16ink4a} in further defining atypical squamous cells cannot exclude a high grade lesion on cervical cytology (ASC-H): results of a pilot study. *South Afr J Epidemiol Infect*; 2007. 22(4), 109-112
9. Murphy N, et.al. P^{16ink4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep TM smears. *J Clin Pathol*; 2003. 56:56-63. www.jcp.bmj.com
10. Omori M, Hashi A, Nakazawa K, Yuminamochi T, YamaneT, Hirata S, Katoh R, Hoshi K. Estimation of prognoses for cervical intraepithelial neoplasia 2 by p^{16ink4a} immunoexpression and high-risk HPV in situ hybridization signal types. *Am J Clin Pathol*; 2007. 128:208-217.
11. Redman R, Ruffony I, Liu C, Wilkinson EJ, Massol NA. The utility of p16INKy4a in discriminating between cervical intraepithelial neoplasia 1 and non neoplastic equivocal lesions of the cervix. *Arch Pathol Lab Med*; 2008.132:795-99.
12. Safaeian M, Solomon D, Castle PE. Cervical Cancer Prevention-Cervical Screening:Science in Evolution. *Obstet Gynecol Clin N Am*; 2007. 34:739-766
13. Stanley AM. Review Prognostic factors and new therapeutic approaches to cervical cancer. *Virus Research*; 2002. 89:241-248
14. Swanton C. Cell-cycle targeted therapies. *The Lancet Oncol*; 2004. 5:27-36. <http://oncology.thelancet.com>.
15. Tan GC, Norlatiffah S, Sharifah NA, Razmin G, Shiran MS, Hatta AZ, Paul-Ng HO. Immunohistochemical study of p^{16ink4a} and surviving expressions in cervical squamous neoplasm. *Ind J Pathol Microbiol*;2010. 53(1):1-6
16. Wentzensen N, Klug S. Review article Early detection of cervical carcinomas finding an overall approach. *Dtsch Arztebl Int*;2008. 105(37):617-22.