

Perbandingan Ekspresi P53 pada Pterigium Primer Progresif Setelah Pemberian Injeksi Subkonjungtiva dengan Mitomicin C dan 5 Fluorourasil

Santi Anugrahsari, Wasisdi Gunawan, Suhardjo

Department of Ophthalmology

Fakulty of Medicine, Gajah Mada University, Dr. Sardjito General Hospital
Yogyakarta

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the expression ratio of p53 in primary progressive pterygium after subconjunctival injection of Mitomicin C and 5 fluorouracil. This study is quasi experimental with posttest only design, performed at Sardjito Hospital and its networks, are regrouped into 2 groups with injection treatment subconjunctival mitomicin C or 5-FU 1 week before surgery. Tissue stored in buffered formalin, staining with the monoclonal antibody DO-7, mutant p53 expression is calculated per 100 cells, in 5 field of view, 400x magnification. There were 53 subjects, 27 specimens in MMC group and 26 specimens of group 5 FU. Not found significant differences in the characteristics of subjects. In this study, the expression in p53 of MMC groups was 5.71 ± 1.83 , and in 5FU group was 10.29 ± 4.54 ($p = 0.000$). Variable age showed a significant correlation of 0.29 and the average influence p53 expression. The mean expression of p53 in group Mitomicin C group lower than 5Fluorouracil group.

Key words: primary progressive pterygium, mutant p53, mitomicin C, 5 fluorouracil, immunohistochemistry

Correspondence: Santi Anugrahsari, c/o: Perumahan Gejayan Baru, Jl. Mangga, gang Delima kav.12, Gejayan, Condong Catur, Depok, Sleman Yogyakarta. Email: santi_a2006@yahoo.com

PENDAHULUAN

Pterigium adalah salah satu kondisi tersering yang ditemui di daerah dekat ekuator, terutama di daerah subtropis. Pada pengamatan lanjut menunjukkan ekspresi vimentin sel limbal pada tepi pterigium, over ekspresi p53 supressor gen memberi kesan bahwa Ultraviolet B menginduksi mutasi pada awal pertumbuhannya dengan jalan kerusakan apoptosis dari sel limbal serta produksi yang berlebihan dari bermacam-macam faktor pertumbuhan.¹ Pada beberapa laporan penelitian, menunjukkan hubungan erat ultraviolet sebagai pemicu terjadinya mutasi p53. Ekspresi p53 abnormal ditunjukkan pada pterigium dengan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal yang dapat mendeteksi protein p53 mutan.² Terdapat 2 tipe protein p53, yaitu tipe normal atau *wild type* serta *mutant type*. P53 *wild type* dipercaya berperan pada regulasi proliferasi sel dan berperan sebagai tumor suppressor.³

Tingkat kekambuhan pterigium sangat tinggi, mencapai 80%. Salah satu faktor terjadinya kekambuhan adalah berhubungan dengan cara pembedahan. Untuk meningkatkan keberhasilan pembedahan pterigium ada dua strategi yaitu pendekatan destruksi dengan penambahan radiasi dan kemoterapi serta pendekatan rekonstruksi dengan transplantasi dari bermacam-macam jaringan graft.¹

5 Fluorouracil (5FU) adalah obat dari kelompok antagonis pirimidin, dapat menghambat proliferasi fibroblas. Obat ini bekerja menghambat enzim sintetase thymidin dan memengaruhi replikasi sel fase S, bekerja pada RNA. Sedangkan Mitomicin C (MMC) berasal dari *streptomyces caespitosus*, bekerja menghambat proliferasi fibroblast dengan cara memblok replikasi DNA (pada proliferasi sel fase G dan S), mitosis dan sintesis protein. Obat ini 100 kali lebih poten dibandingkan 5 FU dan mempunyai efek toksik pada konsentrasi tinggi.⁴ Keduanya dapat dipakai sebagai terapi tambahan pada operasi pterigium.

Donnenfeld *et al.*, 2003 melaporkan pemberian mitomicin C subkonjungtiva sebelum operasi pterigium efektif dalam menurunkan angka kekambuhan dengan komplikasi minimal. Pemberian mitomicin C subkonjungtiva memungkinkan obat langsung bekerja pada fibroblas aktif dan pada sel-sel yang bertanggung jawab terhadap kekambuhan pterigium tanpa merusak stem sel epitel permukaan.⁵

Paparan Ultraviolet B yang terkait dengan etiologi pterigium menimbulkan mutasi pada tumor supresor gen, p53. Ditemukannya overekspresi dan mutasi gen p53 pada pterigium dan karakteristik seperti tumor maka modalitas terapi dapat berupa agen antikanker. Agen kemoterapi berupa Mitomicin C dan 5 Fluorourasil yang digunakan selama ini sebagai terapi adjuvan dan bertujuan untuk menurunkan angka kekambuhan pterigium belum pernah diteliti efeknya pada ekspresi p53 mutan melalui teknik imunohistokimia.

Berdasarkan uraian di atas, timbul permasalahan pada penelitian ini yaitu apakah terdapat perbedaan ekspresi p53 pada pemberian Mitomicin C subkonjungtiva dibandingkan dengan 5 Fluorourasil pada pterigium primer progresif, oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengetahui perbandingan ekspresi p53 pada pterigium primer progresif setelah pemberian injeksi subkonjungtiva Mitomicin C dan 5 Fluorourasil.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian ini adalah kuasi eksperimental yaitu *post test only design*. Subjek Penelitian adalah penderita pterigium di Poliklinik Mata RS Dr. Sardjito Yogyakarta dan RS jejaring. Kriteria inklusi meliputi; penderita pterigium primer progresif, umur kurang dari 50 tahun, bebas terapi kortikosteroid minimal 2 minggu terakhir, tidak ada kontraindikasi dilakukan eksisi dengan *bare sclera*, pterigium tumbuh pada sisi nasal konjungtiva, tidak sedang menderita peradangan aktif pada mata, tidak ada riwayat alergi terhadap obat sebelumnya, bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*. Kriteria eksklusi meliputi: Naracoba yang mengalami efek samping dalam jangka waktu pemberian obat hingga ekstirpasi pterigium, sampel yang tidak dapat dinilai oleh ahli Patologi Anatomi. Naracoba yang memenuhi kriteria terpakai dilakukan pemeriksaan awal meliputi anamnesis, pemeriksaan tajam penglihatan, pemeriksaan segmen anterior dengan slit lamp dan pemeriksaan segmen posterior dengan oftalmoskop. **Dilakukan pencatatan data naracoba**, mengenai usia, paparan sinar ultraviolet, riwayat pemakaian obat-obatan sebelumnya, riwayat alergi obat yang pernah diderita, dan stadium dan ukuran pterigium. Naracoba mengisi kesediaannya untuk mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*, yang sebelumnya memahami dan mengerti mengenai manfaat penelitian serta efek samping yang mungkin terjadi. Naracoba dibagi 2 kelompok secara random alokasi. Kelompok pertama diberi injeksi *Mitomicin C* dan kelompok kedua diberi

injeksi *5 FU*. Naracoba diminta untuk kembali 1 minggu kemudian dihitung dari tanggal penyuntikan, untuk dioperasi dan diambil jaringan pterigiumnya. Jaringan pterigium dari kedua kelompok dimasukkan ke dalam tabung yang berisi buffered formalin. Di laboratorium Patologi Anatomi dilakukan pengecatan dengan antibodi primer (DO-7), dihitung jumlah sel yang positif dalam 5 lapang pandang per 100 sel dengan perbesaran 400 kali.

Data nominal karakteristik subjek dianalisa dengan kai kuadrat. Untuk menetapkan beda rerata ekspresi p53 antarkedua kelompok dianalisa dengan nonparametrik yaitu uji *Man Whitney*, dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan ekspresi P53 dengan jenis kelamin, umur, derajat pterigium, lama paparan, pemakaian pelindung dan pekerjaan. **Data yang diperoleh diolah dengan analisis statistik menggunakan komputer.**

HASIL

Dalam kurun waktu penelitian dan terpenuhinya kriteria inklusi dan eksklusi, didapatkan sampel sebanyak 53 subjek yang dapat di hitung ekspresi p53 nya, terdiri dari

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

Karakteristik	Pterigium injeksi MMC (n = 27)	Pterigium injeksi 5FU (n = 26)	p
Usia (tahun)			
25–39	8 (15,09)	9 (16,98)	0,066
40–50	19 (35,85)	17 (32,07)	
Rata-rata	44,04 ± 6,70	45,73 ± 4,87	
Jenis Kelamin			
Laki-laki (%)	10 (18,87)	17 (32,07)	0,056
Perempuan (%)	17 (32,07)	9 (16,98)	
Gradasi			
Derajat 2 (%)	12 (22,64)	20 (37,73)	0,240
Derajat 3 (%)	11 (20,75)	6 (11,32)	
Derajat 4 (%)	4 (7,54)	0	
Pajanan Sinar Matahari	12 (22,64)	14 (26,41)	0,587
> 5 jam per hari (%)	15 (28,30)	12 (22,64)	
< 5 jam per hari (%)			
Pemakaian pelindung			
Topi	12 (22,64)	15 (28,30)	0,283
Kacamata	0	2 (3,77)	
Helm	1 (1,89)	0	
Caping	1 (1,89)	0	
Tanpa pelindung	13 (24,53)	9 (16,98)	
Pekerjaan			
Tidak bekerja	7 (13,20)	2 (3,77)	0,155
Petani	11 (20,75)	11 (20,75)	
Pedagang	6 (11,32)	4 (7,54)	
Buruh	2 (3,77)	3 (5,66)	
Pegawai	1 (1,89)	6 (11,32)	

kelompok injeksi mitomicin C ($n = 27$) dan kelompok injeksi 5 Fluorourasil ($n = 26$). Naracoba perempuan sebanyak 26 (49%) dan laki-laki 27 orang (51%). Rentang usia dalam penelitian ini adalah 25 hingga 50 tahun dengan rerata $44,57 \pm 5,88$ tahun.

Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia pada pterigium dengan injeksi subkonjungtiva MMC dan 5FU 1 minggu sebelum ekstirpasi untuk mengetahui ekspresi p53 dan dinilai rerata ekspresinya, dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 2. Perbedaan Rerata Ekspresi p53 Kedua Kelompok Perlakuan

Ekspresi p53	Kelompok Injeksi MMC ($n = 27$)	Kelompok injeksi 5FU ($n = 26$)	Nilai p
Rerata $\pm$ SD	$5,71 \pm 1,83$	$10,29 \pm 4,54$	0,000
Median	5,2	9,7	
Min – Max	0–9,6	0–21,6	

Pada penelitian ini diketahui rerata ekspresi p53 pada kelompok MMC adalah $5,71 \pm 1,83$ dengan nilai minimal 0 hingga nilai maksimal 9,6 per 100 sel, sedangkan pada kelompok 5FU rerata ekspresi p53 adalah $10,29 \pm 4,54$ dengan nilai minimal 0 dan nilai maksimal 21,6 per 100 sel ($p = 0,000$).

Untuk menilai hubungan antarvariabel terhadap ekspresi p53, dilakukan uji korelasi dengan hasil sebagai berikut:

Tabel 3. Hubungan antarvariabel terhadap ekspresi p53

Variabel	β	P	CI 95 %
Umur	0,293	0,047	0,003–0,411
Jenis Kelamin	-0,291	0,061	-4,925–0,114
Paparan sinar matahari	0,064	0,685	-2,095–3,158
Pelindung	0,142	0,330	-0,315–0,917
Derajat Pterigium	-0,157	0,276	-3,025–0,885
Jenis Pekerjaan	-0,126	0,482	-1,570–0,753

Keterangan:

β : koefisien standar

DISKUSI

Rata-rata usia subjek penelitian pada kelompok MMC adalah $44,04 \pm 6,70$ tahun dan pada kelompok 5FU adalah $45,73 \pm 4,87$ ($p = 0,066$). Jumlah subjek laki-laki pada kelompok MMC sebanyak 10 orang (18,87%) dan perempuan sebanyak 17 orang (32,07%), sedangkan jumlah laki-laki pada kelompok 5FU sebanyak 17 orang (32,07%) dan perempuan sebanyak 9 orang (16,98%) ($p = 0,056$). Pada penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna pada karakteristik subjek penelitian. Dari hasil di atas, dapat dikatakan bahwa kedua kelompok perlakuan pada saat awal seragam (homogen).

Secara epidemiologi, radiasi UV-B berhubungan dengan agen etiologi bagi pterigium dan tumor-tumor limbal dan radiasi UV B sebagai agen mutagenik bagi tumor supresor gen p53. Peningkatan ekspresi nuklear p53 tanpa apoptosis ditemukan pada epitel limbal pterigium, tumor-tumor limbal dan pinguekula. Karena kerusakan p53 bergantung pada mekanisme *program cells death*, mutasi pada gen yang lain secara progresif mengikuti perkembangan banyak tahap pterigium dan sel tumor limbal dari ekspresi p53.⁶

Aplikasi subkonjungtiva dapat meminimalisasi paparan permukaan bolamata dan mengurangi toksisitas stem sel epitel, dan memungkinkan obat langsung bekerja pada fibroblast yang aktif. Kedua antimetabolit, Mitomicin C dan 5FU menghambat aktivitas fibroblast. Tidak seperti 5FU, MMC bekerja pada hampir semua fase siklus sel.^{5,7}

Mitomicin C (MMC) sebagai agen anikilating DNA, menstabilkan p53 dengan fosforilasi p53 pada N terminus dengan menurunkan level *Mouse dependent Minutes 2* (MDM2) mRNA dan protein serta penurunan ubiquitinasi p53. Agen anikilating DNA membuat formasi cincin nitrogen atau siklik oksigen ekstra pada nukleotida, sehingga terjadi kehilangan kromosom atau mutasi basa tunggal. MMC dapat menstabilkan p53 tipe wild maupun mutant.⁸

5 Fluorouracil (5FU) merupakan agen kemoterapi dan digunakan pada berbagai tumor solid. Aktivitas sebagai antitumor dikarenakan aktivitasnya yang dapat menginduksi penghentian p53-dependent cell dan apoptosis. 5FU dapat menstabilkan p53 dengan menghambat MDM2-mediated ubiquitylation dan degradasi p53, penelitian sebelumnya yang juga dilakukan oleh Sun *et al.*, 2007 menunjukkan adanya peran 3 protein ribosom yaitu L5, L11 dan L23 yang langsung berikatan pada MDM2 sehingga mengakibatkan inhibisi MDM2 mediated p53 ubiquitylation dan degradasinya, sehingga terjadi stabilisasi dan aktivasi p53 serta terhentinya siklus sel G1/S.⁹

Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya efek samping yang terjadi pada dua kelompok perlakuan. Kelemahan penelitian ini antara lain tidak mengetahui ekspresi p53 awal sebelum penyuntikan obat, sehingga sulit membandingkan efektivitas kedua obat dalam menurunkan ekspresi p53, serta kelemahan teknik imunohistokimia yang sangat dipengaruhi oleh alat dan bahan, pemotongan jaringan, pengecatan preparat dan media penyimpanan, keterbatasan teknik imunohistokimia yang hanya sebatas tingkat protein, sehingga kita tidak bisa mengetahui seberapa banyak apoptosis yang terjadi dan letak terjadinya mutasi p53.

Dengan ditemukannya overekspresi dan mutasi p53 pada pterigium, dan karakteristik seperti tumor yaitu displasia ringan, invansi lokal, instabilitas mikrosatelit dan *loss of heterozygosity*, mendukung teori pterigium sebagai suatu lesi tumor jinak, maka modalitas terapi pterigium dapat menggunakan agen antikanker seperti mitomicin C dan 5 Fluorourasil.^{10,11}

Dari penelitian ini diketahui bahwa tingkat kemaknaan variabel Jenis Kelamin, Paparan Sinar Matahari, Pemakaian

Pelindung, Derajat Pterigium dan Jenis Pekerjaan di atas 0,05, maka koefisien regresi tidak signifikan. Hanya variabel umur yang berpengaruh signifikan 0,29 terhadap ekspresi p53.

KESIMPULAN

Rerata ekspresi p53 pada kelompok injeksi Mitomicin C lebih rendah dari kelompok 5 Fluorourasil subkonjungtiva. Agen antikanker tersebut dapat berpengaruh terhadap ekspresi p53.

DAFTAR PUSTAKA

1. Assia E. Surgical management of pterygium. *IMAJ* 2002; 4: 1138–1139.
2. Shimmura S, Ishioka M, Hanada K, Shimazaki J, Tsubota K. Telomerase activity and p53 expression in pterygia, *Investigative Ophthalmol & Vis Science*, May 2000, Vol. 11 No. 6.
3. Nasiri MRG, Rezaei E, Ghafarzadegan K, Toosi MS, Malekifard. Expression of p53 in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathologic features, *Arch Iran Med*, Vol. 10, Number 1, January 2007.
4. Sumantri I. Pemberian anti metabolit pada bedah trabekulektomi, The 10th National Congress and 29th Annual Meeting, June 7–10th, 2003, Yogyakarta.
5. Donnenfeld ED, Perry HD, Fromer S, Doshi S, Solomon R, Biser S. Subconjunctival Mitomycin C as adjunctive therapy before pterygium excision, *Ophthalmology* 2003; 110: 1012–1026.
6. Duskhu N, Hatcher S L S, Albert D M, Reid T W. p 53 Expression and relation to Human Papillomavirus Infection in pingueculae, pterygia and limbal Tumors, *Arch Ophthalmol*, 1999; 117: 1593–1599
7. Prabhasawat P, Tesavibul N, Leelapatranura K, Phonjan T. Efficacy of subconjunctival 5 Fluorouracil and Triamcinolone injection in impending recurrent pterygium, *Ophthalmology* 2006; 113: 1102–1109.
8. Inoue T, Geyer RK, Zhong KY, Maki, CG. Downregulation of MDM2 stabilizes p53 by inhibiting p53 ubiquitination in response to specific alkylating agents, *FEBS Letters* 490 (2001) 196–201.
9. Sun X X, Dai M S, Lu H. 5-Fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction, *J Biol Chem*, Jan, 22, 2007
10. Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilsar M, Pery J F. Proliferative activity and p53 Expression in primary and recurrent pterygia, *Ophthalmology* 2001; 108: 985–988.
11. Tan D T H, Holland E J, Mannis M J , 2002, Ocular surface disease, medical and surgical management, Springer, New York.