

CORRELATION OF Ki67 EXPRESSION TO DEGREE OF DYSPLASIA IN LINGUAL EPITHELIAL DYSPLASIA IN *Rattus norvegicus* EXPOSED BY CIGARETTE SMOKE

(Hubungan Ekspresi Ki67 Terhadap Derajat Displasia Pada Epitel Mukosa Lidah *Rattus norvegicus* yang Dipapar Asap Rokok)

Rina Kartika Sari*, Hening Tuti Hendarti**, Bagus Soebadi**, Priyo Hadi**, Desiana Radithia**, Adiastuti Endah P**

Keywords:

Cigarette smoke,
Dysplasia, Ki67,
Lingual Epithelium

ABSTRACT

Background: Dysplasia is malignant transformation of stratified squamous epithelium characterized by cellular atypia and loss of stratification and maturation. It can caused by cigarette smoke. Measuring the activity of cell proliferation as the beginning of dysplasia is very useful to know the development of malignancy. One of proliferation marker is Ki67 that expressed in all cell cycle phase except G0.

Methods: 30 male wistar rats divided into: control grup (n=10), exposed to cigarette smoke for 4 weeks (n=10), 8 weeks (n=10) as much as 20 cigarettes/group/day/exposure used smoking pump. Specimen were stained HE to see dysplasia and Ki67 expression seen immunohistochemically. Statistical analyzed by Spearman correlation.

Result: There was an increase in mean of Ki67 expression and significant differences between groups ($p=0,000$) and also significant difference of degree of dysplasia between groups ($p=0,000$). There was a strong correlation between Ki67 score to degree of dysplasia ($p=0.001$).

Conclusion: Increased of Ki67 expression proportional to the Increase in degrees of dysplasia

PENDAHULUAN

Displasia berasal dari kata Yunani kuno yaitu $\delta\upsilon\sigma$ -/*dys/dis* yang berarti abnormal/buruk dan $\pi\lambda\acute{\alpha}\sigma\iota\varsigma$ /*plasia/plasis* yang berarti pertumbuhan/pembentukan awalnya dikenalkan oleh Reagon tahun 1958 untuk sel yang terlepas dari serviks uterus. Istilah displasia digunakan dalam bidang patologi yang berarti pertumbuhan abnormal atau kelainan pertumbuhan dan diferensiasi epitel. Displasia adalah gambaran histopatologis yang menunjukkan perubahan ke arah keganasan pada *stratified squamous epithelium*

yang ditandai dengan atipia seluler dan hilangnya maturasi dan stratifikasi. Adanya displasia epitel digunakan dalam memprediksi keganasan dibandingkan perubahan gambaran klinis^{1,2,3}. Sel displasia secara histologis nampak disorganisasi sel, mitosis abnormal, nukleus hiperkromasi dan sel pleomorfisme dimana tingkatan displasia terdiri dari ringan, sedang, berat dan *carcinoma in situ*⁴.

Di seluruh dunia, kanker mulut menduduki peringkat ke 6 diantara semua jenis kanker

*Oral Medicine Department, Faculty of Dentistry, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Indonesia

**Oral Medicine Departement, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence: Rina Kartika Sari, Oral Medicine Departement, Faculty of Dentistry, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang, Indonesia, Jln Kaligawe Raya KM 4, Genuk, Semarang, Indonesia 50112.
Email: rina.kartika@unissula.ac.id

dimana sebesar 90% kanker mulut merupakan karsinoma sel skuamosa⁵. Tingginya angka tersebut karena pasien biasanya datang berobat saat sudah menjadi parah akibat kurangnya deteksi dini kanker mulut⁶.

Indonesia merupakan negara yang mengkonsumsi tembakau terbesar kelima di dunia dengan perkiraan konsumsi 215 milyar rokok per tahun⁷. Merokok adalah faktor penyebab paling banyak terjadinya karsinoma sel skuamosa, namun dalam perkembangannya berhubungan dan tergantung pada beberapa faktor lain seperti jumlah rokok yang dikonsumsi dan jumlah kandungan tar pada rokok⁸. Bahaya rokok bukan hanya pada perokok aktif, namun juga mengenai perokok pasif⁹.

Setiap batang rokok yang dibakar akan menghasilkan kira-kira 5000 mg gas (92%) dan bahan partikel padat (8%). Komponen gas terdiri dari karbon monoksida, karbon dioksida, hidrogen sianida, amoniak, oksida dari nitrogen dan senyawa hidrokarbon. Adapun komponen partikel terdiri dari *tar*, *nikotin*, *benzantracne*, *benzopiren*, *fenol*, *cadmium*, dll. Partikel seperti *benzopiren*, *dibenzopiren*, *benzantracne* dan *uretan* dikenal sebagai bahan karsinogen, pada benzopiren bersifat mutagenik dan karsinogenik¹⁰.

Proliferasi sel adalah proses biologis yang penting pada organisme hidup dan berperan penting dalam pertumbuhan dan menjaga keseimbangan jaringan. Pengendalian terhadap proses ini sangat penting untuk mencegah kanker dan pengukuran aktivitas proliferasi sel sangat berguna untuk mengetahui perkembangan ke arah keganasan, sebagai

diagnosis, sifat klinis kanker dan repon terhadap terapi¹¹. Salah satu metode untuk mengetahui karakteristik proliferasi yaitu menggunakan metode imunohistokimia dengan antibodi monoklonal yang mendeteksi karakteristik siklus sel secara spesifik.

Marker proliferasi yang banyak digunakan antara lain Ki67. Protein Ki67 diekspresikan pada semua sel yang mengalami proliferasi dan dapat terdeteksi selama fase aktif siklus sel (G1,S,G2 dan mitosis) kecuali fase istirahat G0. Protein ini dikode oleh gen yang terletak pada kromosom 10q25 yang berperan pada regulasi siklus sel, sintesis ribosom, dan berhubungan dengan ketahanan, keganasan dan prognosis bermacam neoplasma termasuk karsinoma sel skuamosa oral¹¹.

Menurut penelitian yang menganalisa antigen Ki67 pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut dengan metode imunohistokimia menunjukkan penanda proliferasi tumor Ki67 berhubungan dengan derajat histologis pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut manusia^{12,13}. Penelitian tentang marker proliferasi Ki67 baik pada perokok aktif maupun pasif sebagai faktor resiko terjadinya kanker mulut belum banyak dilakukan pada manusia tidak hanya karena keterbatasan pertimbangan etik penelitian namun juga banyaknya variabel yang tidak dapat dikendalikan pada manusia seperti karakteristik sosioekonomi, status nutrisi, dan faktor genetik, sehingga diperlukan penelitian menggunakan hewan coba.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka perlu dilakukan penelitian terhadap ekspresi Ki67 dan derajat displasia pada epitel mukosa lidah hewan

coba tikus wistar yang dipapar dan tidak dipapar asap rokok.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium. Penelitian dilakukan setelah lulus uji kelayakan etik dengan Nomor: 184/HERCC.FODM/XI/2017. Sebanyak 30 tikus dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing 10 ekor tikus menggunakan metode *simple random sampling*. Tikus yang digunakan yaitu jenis tikus wistar (*Rattus norvegicus*) berusia 3 bulan dengan berat dan sehat selama masa adaptasi 1 minggu. Tikus diberi paparan asap rokok selama 4 minggu (P1), selama 8 minggu (P2) dan tidak dipapar asap rokok (K) masing-masing 10 ekor menggunakan alat *smoking pump* elektrik sebanyak 20 batang/hari/kelompok (2 batang/tikus). Rokok yang digunakan adalah jenis kretek dengan kandungan tar 34 mg dan nikotin 2,1 mg. Setelah 4 minggu dan 8 minggu tikus didekapitasi dengan inhalasi ether dan diambil jaringan lidahnya. Jaringan dibuat blok paraffin dan dipotong membujur kemudian diberi pewarnaan HE untuk melihat derajat displasia dan pewarnaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal Ki67. Derajat displasia dilihat dengan cara membagi lidah menjadi 3 bagian yaitu apex, tengah dan radix. Diambil bagian yang terparah, kemudian dibagi menjadi 5 lapang pandang dan dirata-rata. Pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 1000x merk *Nikon H600L* yang dilengkapi dengan digital camera DS Fi2 300 megapixel dan *soft ware* pengolah gambar *Nikkon Image System..*

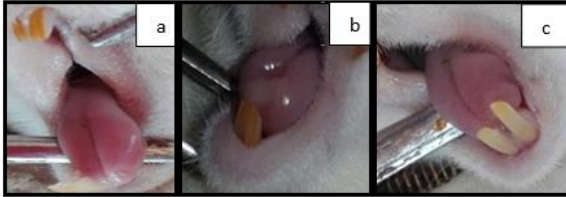
Skor displasia dikategorikan menurut Speight, 1996 yaitu : 0 : bila tidak terjadi perubahan displastik; 1 : displasia ringan, bila perubahan displastik hanya nampak di lapisan parabasal, dengan tingkat mitosis rendah; 2 : displasia sedang, bila perubahan displastik meluas hingga sepertiga tebal lapisan epitel, dengan tingkat mitosis sedang; 3 : displasia berat, bila bila perubahan displastik meluas hingga lapisan paling atas epitel, dengan tingkat mitosis berat disertai diskeratosis.

Pemeriksaan ekspresi Ki67 dilakukan dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal Ki67 dimana jaringan epitel mukosa lidah secara keseluruhan dibagi 20 lapang pandang dengan pembesaran 1000x kemudian dirata-rata^{14,15}. Skor Ki67 dikategorikan skor 0 = ekspresi Ki67 <5%, skor 1 = ekspresi Ki67 5%-10%, skor 2 = ekspresi Ki67 10%-20%, skor 3 = 20%-30%, skor 4 = 30%-50%, skor 5 = >50%¹⁶.

Analisis data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk menguji normalitas dan *Shapiro-Wilk* untuk uji homogenitas. Analisis *One Way ANOVA* untuk membandingkan ekspresi Ki67 antar kelompok dilanjutkan analisis *Post Hoc* dengan *Tukey HSD*. Analisis menggunakan *Kruskal Wallis* untuk membandingkan derajat displasia dan skor Ki67 antar kelompok. Kemudian untuk menghubungkan skor Ki67 dengan skor derajat displasia dengan menggunakan Korelasi *Spearman*.

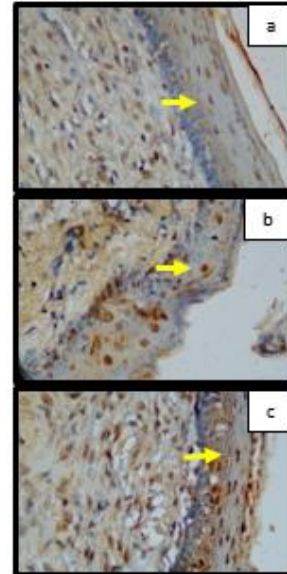
HASIL

Secara klinis, tidak didapatkan tanda-tanda perubahan atau adanya lesi pada rongga mulut tikus baik pada minggu ke 4 dan minggu ke 8 serta kontrol (Gambar 5.1)

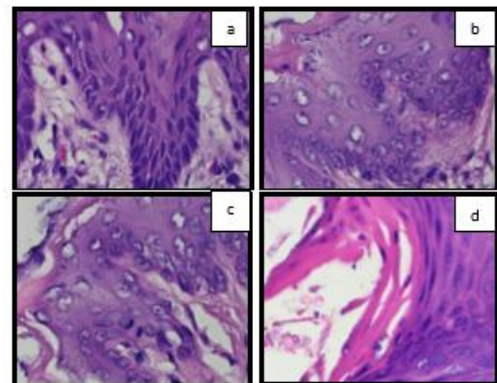


Gambar 1. Foto gambaran klinis lidah tikus pada kelompok P1(a); kelompok P2 (b) dan kelompok K (c).

Gambaran ekspresi Ki67 terlihat pada gambar 2. Gambaran berwarna coklat pada nukleus adalah ekspresi Ki67 pada lapisan epitel yang ditunjukkan dengan anak panah. Sedangkan warna kecoklatan pada sitoplasma dan lapisan sub epitel tidak dihitung. Ekspresi Ki67 paling banyak terdapat pada kelompok paparan asap rokok 8 minggu (P2)



Gambar 2. Gambaran histologis ekspresi Ki67 pada kelompok K (a); kelompok P1 (b); kelompok P2 (c). Pemeriksaan dilakukan dengan metode imunohistokimia, dilihat menggunakan mikroskop elektrik dengan pembesaran 1000 kali.



Gambar 3. Gambaran histologis derajat displasia pada kelompok K menunjukkan tidak adanya displasia (a); kelompok P1 menunjukkan displasia ringan (b); gambaran displasia sedang (c); gambaran displasia berat disertai diskeratosis pada kelompok P2 (d); Pemeriksaan

dilakukan dengan metode *Haematoxylin Eosin*, dilihat menggunakan mikroskop elektrik dengan pembesaran 1000 kali

Gambaran histopatologik dengan pewarnaan HE menunjukkan adanya perubahan displastik yang nampak pada lapisan parabasal, 1/3 epitel, dan seluruh epitel, dengan tingkat mitosis dan adanya diskeratosis dari kelompok P1 dan P2 (Gambar 3.b,c,d). Pada kelompok K seluruh susunan sel epitel terutama di bagian parabasal masih baik, bentuk dan ukuran masih sama, serta tidak ada gambaran mitosis abnormal (Gambar 3.a)

Hasil rerata ekspresi Ki67 pada tiap kelompok mengalami peningkatan. Kelompok K memiliki rerata ekspresi Ki67 paling sedikit, sedangkan kelompok P2 memiliki rerata ekspresi Ki67 paling tinggi.

Tabel 1. Analisis hasil rerata ekspresi Ki67

Variabel	Rerata Ekspresi Ki67	P Value
Kelompok K	5.10±2,685	0,000
Kelompok P1	9.80±2,530	
Kelompok P2	13.90±2,923	

Terdapat perbedaan rerata ekspresi Ki67 yang signifikan antara ketiga kelompok ($p=0,000$) dan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok kontrol dan kelompok P1 ($p=0,002$), kelompok kontrol dan kelompok P2 ($p=0,000$) dan antara

kelompok P1 dan P2 ($p=0,006$) dengan nilai signifikansi $p<0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan ekspresi Ki67 yang signifikan antara paparan asap rokok selama 4 minggu, 8 minggu dan tidak dipapar asap rokok.

Tabel 2. Analisis hasil jumlah skor ekspresi Ki67 antar kelompok kontrol, kelompok P1 (paparan 4 minggu), kelompok P2 (paparan 8 minggu)

Kelompok	Skor Ki67			P Value
	Skor 0	Skor 1	Skor 2	
K	5	1	0	0,000
P1	0	6	4	
P2	0	1	9	

Catatan: Signifikan pada nilai $p<0.05$

Tabel 3. Analisis hasil skor derajat displasia

Kelompok	Skor Derajat Displasia				P Value
	Skor 0	Skor 1	Skor 2	Skor 3	
Kontrol	10	0	0	0	0,000
P1	6	4	0	0	
P2	0	4	4	2	

Catatan: Signifikan pada nilai $p<0.05$

Tabel 4. Analisis korelasi Skor Ki67 dan Skor Displasia

Skor Displasia	Skor Ki67			P Value
	Kontrol	P1	P2	
Kontrol	-	-	-	0,001
P1	0,242	0,486	0,242	$r=0,569$
P2	1,000	0,393	0,144	

Catatan: Signifikan pada nilai $p<0.05$

Analisis korelasi Spearman menunjukkan hubungan skor Ki67 dan displasia semua kelompok didapatkan korelasi yang signifikan ($p = 0,001$) dimana nilai signifikansi $p < 0,05$ dan korelasi positif yang kuat ($r = 0,569$) antara skor ekspresi Ki67 dengan skor derajat displasia dimana semakin tinggi skor Ki67 maka skor displasia semakin berat.

DISKUSI

Proliferasi sel yang tidak terkendali merupakan suatu tanda adanya proses keganasan. Tingkat proliferasi dapat dilihat dari ekspresi Ki67 dengan pemeriksaan imunohistokimia dan perubahan ke arah keganasan dilihat dari adanya displasia dengan pemeriksaan histopatologis menggunakan pewarnaan HE.

Pertimbangan lain dalam penggunaan tikus wistar sebagai hewan coba adalah terdapat kesamaan antara mukosa mulut tikus dan mukosa manusia¹⁷, Epitel mukosa mulut pada tikus terdiri atas 3 lapisan sama seperti pada epitel mukosa mulut manusia, yaitu epitel permukaan, epitel sulkus, dan epitel perlekatan. Hewan coba memiliki waktu regenerasi pada jaringan mukosa mulut yang berbeda. Pada palatum, lidah dan pipi pada hewan coba, waktu regenerasi berkisar antara 5–6 hari. Pada tikus yang normal, aktivitas mitosis terjadi selama 24 jam dengan tingkat aktivitas tertinggi pada pagi hari dan terendah pada sore hari¹⁸ Tikus wistar yang digunakan berjenis kelamin jantan agar tidak ada pengaruh hormonal yang dapat mengganggu variabel penelitian.

Pada penelitian ini, jaringan rongga mulut tikus yang diperiksa adalah lidah bagian lateral. Membran mukosa disini bersifat licin, elastis dan banyak terdapat pembuluh darah dan pembuluh limfe yang menyebabkan lidah mudah bergerak. Selain itu, bagian rongga mulut yang memiliki risiko tinggi terjadinya kanker mulut antara lain lateral lidah, dasar mulut dan ventral lidah karena sisi anatomis tersebut lebih banyak terkena kumpulan bahan karsinogen yang larut dalam saliva dan mudah terkena trauma dari gigi¹⁹. Pengambilan spesimen bibir meskipun bagian ekstraoral tikus banyak terpapar asap rokok tidak dilakukan dikarenakan sulitnya posisi anatomis untuk pengambilan jaringan bibir tikus.

Lebih dari 300 karsinogen pada asap rokok dapat larut dan lepas ke dalam saliva diantaranya *aromatic hydrocarbon benz(a)pyrene* dan *tobacco specific nitrosamines (TSNs)*, *nitroso-nor-nicotine (NNN)*, *nitrosopyrrolidine (NPYR)*, *nitrosodimethylamine (NDMA)*, dan *4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)*. *Polycyclic aromatic hydrocarbon* adalah bahan karsinogen yang ada pada Tar. Bahan-bahan karsinogen diatas bereaksi selama proses pembakaran menjadi gas, diabsorpsi oleh jaringan rongga mulut dan menyebabkan kerusakan DNA²⁰. Paparan bahan karsinogen berinteraksi dengan enzim sitokrom P450 menyebabkan radikal bebas yang dapat merusak DNA. Kerusakan DNA akan diperbaiki oleh *DNA repair gene* secara langsung melalui enzim *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*. Jika kerusakan DNA tidak diperbaiki hingga tahap replikasi, maka replikasi DNA akan berhenti, terjadi kematian sel atau justru

menyebabkan terbentuknya sel baru yang memiliki kerusakan DNA (mutasi DNA) dengan fenotip baru dan jika *protooncogene* dan *tumor suppressor gene* terlibat maka akan mengawali proses karsinogenesis²⁰.

Pemotongan jaringan secara membujur pada penelitian ini dimaksudkan untuk melihat susunan epitel dan sub epitel, perubahan displasia yang ditandai dengan adanya hiperplasia, kehilangan keseragaman pola pada lapisan basal, *cellular pleomorphism*, peningkatan mitosis, adanya diskeratosis dan susunan epitel yang abnormal. Perubahan tersebut apabila terjadi hanya pada 1/3 lapisan basal maka dikategorikan sebagai displasia ringan, apabila terjadi pada 1/3 hingga 2/3 lapisan basal maka dikategorikan sebagai displasia sedang dan apabila perubahan tersebut terjadi pada lebih dari 2/3 lapisan basal maka dikategorikan sebagai displasia berat³.

Paparan asap rokok pada penelitian ini menggunakan rokok jenis kretek dengan kandungan Tar 34 mg dan nikotin 2,1 mg karena rokok kretek tanpa filter lebih berbahaya daripada rokok filter dimana secara umum kandungan tar, nikotin, dan karbon monoksida di dalamnya lebih tinggi yaitu nikotin 1,2-4,5mg, tar 46,8mg dan CO 28,3mg sedangkan rokok filter memiliki kandungan nikotin 1,1 mg, 16,3 mg dan CO 15,5 mg. Selain itu rokok kretek memiliki tambahan bahan cengkeh dimana campuran antara tembakau dan cengkeh akan meningkatkan suhu rokok ketika terbakar sehingga kadar CO₂ dan nikotin naik menjadi 3x lipat sedangkan tar meningkat menjadi 5x lipat^{7,19}.

Waktu pemaparan asap rokok pada beberapa penelitian sangat bervariasi dari mulai 1 minggu hingga 96 minggu²¹. Pada penelitian sebelumnya paparan asap rokok pada tikus selama 4 minggu dan 12 minggu baru terjadi hiperplasia dan displasia ringan. Selain dikarenakan keterbatasan waktu, peneliti menggunakan waktu yang lebih singkat yaitu 4 minggu dan 8 minggu serta meningkatkan dosis tar dan nikotin pada rokok yang digunakan dengan harapan dengan waktu yang lebih singkat sudah terjadi perubahan derajat displasia yang lebih bervariasi

Metode pemaparan asap rokok yang banyak digunakan yaitu paparan seluruh tubuh (*full-body exposure*), injeksi nikotin atau paparan hanya pada hidung (*nose-only exposure*). Paparan hanya pada hidung lebih menyerupai perokok aktif namun secara klinis sulit dilakukan karena harus memasang masker pada hewan coba selama beberapa waktu sehingga paparan seluruh tubuh lebih banyak dipilih²². Sehingga pada penelitian ini menggunakan paparan *full body exposure* yang menyerupai paparan asap rokok pada manusia, selain itu penelitian ini bertujuan untuk melihat perubahan pada rongga mulut akibat paparan asap rokok sehingga metode *nose-only exposure* tidak digunakan. Namun untuk mengefektifkan asap rokok yang mengenai setiap tikus, peneliti merancang alat yang dapat memfiksasi badan tikus yang dipapar sehingga tikus asap rokok lebih efektif mengenai setiap tikus.

Beberapa penelitian sebelumnya menemukan bahwa insiden lesi neoplasia meningkat dengan durasi pemaparan antara lain

40% selama 75-120 hari, 50% terpapar selama 121-150 hari, 66,7% terpapar selama 150-180 hari dan 78,3% terpapar selama 181-230 hari²¹. Pada penelitian ini, paparan asap rokok selama 4 minggu dan 8 minggu belum menyebabkan perubahan secara klinis namun secara histologis dan molekuler sudah terdapat perubahan tingkat proliferasi dan tanda awal terjadi displasia. Adanya perubahan atau lesi pada epitel berhubungan dengan durasi paparan asap rokok. Untuk menyebabkan karsinoma dalam waktu kurang dari 75 hari sangat sulit sehingga kemungkinan karena penelitian ini cukup singkat maka secara klinis belum menyebabkan perubahan yang signifikan.

Protein Ki67 terekspresi pada semua tahap siklus sel kecuali pada fase istirahat (G0) dan terekspresi sangat kuat pada nukleus terutama pada fase G2 dan M dimana sel sedang aktif membelah. Pada sel normal, hanya sel pada lapisan basal yang berproliferasi, sedangkan lapisan epitel yang lain terdiri dari sel yang sedang mengalami proses maturasi tanpa aktivitas proliferasi. Apabila terjadi aktivitas proliferasi diatas lapisan basal maka dapat menjadi pertanda adanya suatu perubahan ke arah keganasan. Pengamatan ekspresi Ki67 pada penelitian ini dihitung berdasarkan deteksi pada sel yang berwarna kecoklatan dengan karakteristik globular atau granular pada nukleus. Semua nukleus yang terwarnai tanpa melihat intensitas pewarnaan dihitung sebagai positif. Berdasarkan hasil pemeriksaan imunohistokimia pada penelitian ini, ekspresi Ki67 pada kelompok K ditemukan pada lapisan basal dan sedikit pada lapisan granulosum dan susunan sel pada

lapisan basal masih baik berwarna biru cerah yang menandakan sel normal. Pada kelompok P1 ekspresi Ki67 semakin banyak, intensitas warna kecoklatan lebih menggelap dan membesar dan terdistribusi hampir lebih dari setengah ketebalan epitel, sedangkan pada kelompok P2 ekspresi Ki67 terdistribusi hampir pada seluruh lapisan epitel hingga lapisan korneum, lebih banyak, membesar dan intensitas warna kecoklatan lebih gelap dan bergranulasi. Hal ini menandakan bahwa paparan asap rokok menyebabkan peningkatan proliferasi dan gangguan maturasi sel epitel yang ditandai dengan distribusi ekspresi Ki67 yang mengalami perubahan.

Pada penelitian ini, hasil pengamatan ekspresi Ki67 menunjukkan bahwa rerata ekspresi Ki67 mengalami peningkatan dari kelompok K, P1, P2. Hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok. Hal ini menandakan bahwa peningkatan ekspresi Ki67 menunjukkan adanya proliferasi yang meningkat dan merupakan bentuk respon adanya jejas. Durasi paparan asap rokok berpengaruh dalam menyebabkan perubahan tingkat proliferasi secara molekuler pada rongga mulut terutama lidah untuk mengatasi adanya trauma fisik dan kimiawi dari rokok.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yang meneliti ekspresi Ki67 pada lesi leukoplakia dengan displasia ringan dan *well-differentiated* OSCC, dibandingkan dengan jaringan normal membuktikan adanya peningkatan ekspresi Ki67 pada mukosa mulut yang normal (nilai rerata

ekspresi Ki67 8%), leukoplakia dengan displasia ringan (nilai rerata ekspresi Ki67 25,5%) dan *well-differentiated OSCC* (nilai rerata ekspresi Ki67 29,7%)²³. Selain itu penelitian lain yang meneliti lesi pre kanker dan kanker, membuktikan adanya peningkatan dan perbedaan yang signifikan dari ekspresi Ki67 dan p53 pada lesi pre malignan dan malignan dibandingkan dengan mukosa normal²⁴.

Pada penelitian sebelumnya yang melihat efek *passive smoking* pada laring dan trakea menggunakan tikus wistar selama 120 hari belum didapatkan adanya perubahan displasia namun hanya ada peradangan. Penelitian tersebut menggunakan rokok dengan kandungan 10 mg tar dan 0,8 mg nikotin, sebanyak 16 batang per hari untuk 16 tikus (1 batang/per tikus) yang dibagi dalam 4 kali paparan²⁵, sedangkan pengamatan derajat displasia pada penelitian ini menunjukkan terjadi peningkatan dan perbedaan yang signifikan derajat displasia antara kelompok K dengan kelompok P1, demikian juga antara kelompok kontrol dengan kelompok P2, dan antar ketiga kelompok. Hal ini dikarenakan pada penelitian ini menggunakan rokok kretek dengan kandungan tar dan nikotin yang lebih tinggi (34mg tar dan 2,1 mg nikotin) dan jumlah rokok yang lebih banyak per hari nya (2 batang/hari/tikus). Hal ini membuktikan bahwa lamanya paparan asap rokok menyebabkan risiko terjadinya displasia epitel rongga mulut. Pada manusia, terjadinya displasia dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yaitu frekuensi, usia mulai merokok, waktu berhenti dan jumlah konsumsi rokok secara keseluruhan.

Hasil derajat displasia pada penelitian ini, pada kelompok K tidak ditemukan displasia dan susunan sel masih normal, hal ini dikarenakan pada kelompok K tidak diberikan paparan asap rokok dan tikus hanya ditempatkan dalam ruang yang terhubung dengan udara segar . Pada kelompok P1 sudah ditemukan displasia ringan dan sebagian tidak mengalami displasia, demikian juga pada kelompok P2 terjadi derajat displasia yang bervariasi. Perbedaan derajat displasia tiap kelompok perlakuan yang bervariasi ini dapat dikarenakan variasi gen setiap tikus dalam menyebabkan perubahan sel sehingga dalam satu kelompok pemaparan didapatkan hasil yang bervariasi. Menurut literatur, terdapat sekitar 600 gen yang mempengaruhi proses perubahan sel normal ke arah keganasan antara lain *transcription factors, oncogenes, differentiation markers, tumor suppressors and metastatic protein*²⁶. Selain itu nikotin dan zat lain yang masuk ke dalam tubuh tikus berbeda satu sama lain walaupun jumlah paparan asap rokok yang digunakan sama. Sehingga dapat disimpulkan bahwa derajat displasia dipengaruhi oleh beberapa faktor lain seperti genetik dan faktor zat karsinogenik yang masuk ke dalam tubuh.

Analisis hubungan skor Ki67 dan skor displasia pada penelitian ini antar kelompok kontrol tidak dapat diukur karena variasi data yang kurang baik yaitu skor displasia kelompok K semuanya menunjukkan skor 0, sehingga analisis statistik kelompok kontrol tidak dapat diukur. Pada analisis antar kelompok P1 dan P2 tidak menunjukkan hubungan yang signifikan antara skor Ki67 dan derajat displasia ($p > 0,05$), hal ini kemungkinan dikarenakan jumlah sampel

yang sedikit pada tiap kelompok dan sebaran data hasil scoring yang kurang bervariasi.

Pada kelompok K tidak ditemukan displasia dan ekspresi Ki67 <5% (proliferasi normal) maka diberikan skor 0 sehingga tidak ada perubahan klinis yang terjadi. Pada kelompok P1 ditemukan displasia ringan (skor 1) sebanyak 4 ekor dan 6 ekor tidak terjadi displasia (skor 0) dan skor Ki67 <5% (skor 0) dan 5%-10% (skor 1) menandakan proliferasi normal dan ringan. Pada kelompok P2 sudah ditemukan displasia ringan (skor 1), displasia sedang (skor 2) dan displasia berat (skor 3) dan skor Ki67 hampir semuanya 10%-20% (skor 2). Hal ini menunjukkan lama paparan asap rokok berpengaruh terhadap peningkatan proliferasi dan terjadinya displasia.

Hasil analisis statistik hubungan skor Ki67 dan skor displasia menunjukkan hubungan yang signifikan dan peningkatan skor Ki67 berbanding lurus dengan peningkatan keparahan derajat displasia dimana hubungan antara peningkatan Ki67 dan derajat displasia kuat. Hasil dari penelitian ini sejalan dengan penelitian yang melihat ekspresi p16, p53 dan Ki67 pada spesimen normal, displasia dan karsinoma invasif menunjukkan bahwa pada jaringan normal ekspresi Ki67 hanya terdapat pada lapisan basal kemudian terdapat perbedaan dan peningkatan yang signifikan pada kelompok displasia dan paling tinggi terdapat pada kelompok karsinoma invasif (Angiero et al, 2008). Sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan ekspresi Ki67 berbanding lurus dengan peningkatan keparahan derajat displasia.

KESIMPULAN

Terdapat hubungan yang kuat antara peningkatan ekspresi Ki67 dan peningkatan derajat displasia pada epitel rongga mulut tikus wistar yang dipapar asap rokok. Peningkatan ekspresi Ki67 berbanding lurus dengan peningkatan derajat displasia.

REFERENSI

1. Jain A, Chandurkar K, Umale V, Srivastava R. 2016. Dysplasia in Oral Cavity: A Review. *International Journal of Oral health and Medical Research*. 2(6). pp.107-109
2. Rastogi V, Naveen P, Satyaranjan M, Swati A. 2015. An Insight to Oral Epithelial Dysplasia. *International Journal of Head and Neck Surgery*. 4(2):pp74-82
3. Sadiq H, Gupta P, Singh N, Thakar S, Prabhakar I, Thakral J. 2015. Various Grading Systems of The Oral Epithelial Dysplasia : A Review. *International Journal of Advanced Health Science*. 1(1). pp20-27
4. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. 2008. Oral Epithelial Dysplasia Classification System : Predictive Value, Utility, Weakness and Scope for Improvement. *J Oral Pathol Med*. 37. pp127-133
5. Teoh F, Pavelka N. 2016. How Chemotherapy Increases the Risk of Systemic Candidiasis in Cancer Patients: Current Paradigm and Future Directions. *Pathogens*. 5(1), 6
6. Balan JJ, Roopa S Rao, BR Premalatha, Patil S. 2012. Analysis of Tumor Marker CA 125 in Saliva of Normal and Oral Squamous Cell Carcinoma Patients: A Comparative Study.

- The Journal of Contemporary Dental Practice*, 13(5):pp.671-675
7. Amtha R, Razak IA, Basuki B, Roeslan BO, Gautama W, Puwanto DJ, Ghani WMN, Zain RB. 2014. Tobacco (*Kretek*) Smoking, Betel Quid Chewing and Risk of Oral Cancer in a Selected Jakarta Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15 (20), 8673-8678
 8. Field, A; Longman, L; Tyldesley, W. 2004. Tyldesley's Oral Medicine. 5thed. Oxford University Press Inc. p 70-71 press Inc. p 70-71
 9. Fitria, Triandhini RINKR, Mangimbulude JC, Karwur FF. 2013. Merokok dan Oksidasi DNA. *Sains Medika*. 5(2). 113-120
 10. Poluan H, Kairupan CF, Durry M. 2016. Gambaran histopatologik mukosa laring tikus wistar yang dipapar asap rokok, obat nyamuk bakar, dan kendaraan bermotor. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 4(1)
 11. Moraes M, Maia C, Freitas R, Galvao H. 2012. Cell Proliferation Markers in Oral Squamous Cell carcinoma. *J Mol Biomark Diagn*. S(2). pp1-5
 12. Premalatha B, Uma K. 2010. Analysis of KI-67 Antigen in Human Oral Squamous Cell Carcinoma-An Immunohistochemical Study. *J Int Oral Health*. (2) 1. pp9-16
 13. Damasceno D. C., Silva H. P., Vaz G. F., Vasques-Silva F. A., Calderon I. M., Rudge M. V. (2013). Diabetic rats exercised prior to and during pregnancy: maternal reproductive outcome, biochemical profile, and frequency of fetal anomalies. *Reprod. Sci*. 20, 730-738
 14. Soini, Y., Paakko, P. and Lehto, V-P. 1997, Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer, *American Journal of Pathology*, 153(4): 1041-1048
 15. Bonhin RG, Carvalho GM, Guimaraes AC, Chone CT, Crespo AN, Altemani AM, Amstalden EMI. 2014. Histologic Correlation of Expression of Ki67 in Squamous Cell Carcinoma of The Glottis According to The Degree of Cell Differentiation. *Braz J Otorhinolaryngol*. 80(4). 290-295
 16. Pizem J, Cor A, 2003, Detection of Apoptosis Cells in Tumour Paraffin Section, *Radiol. Oncol.*, 37(4): 225-232
 17. Martinez CC, [Padilla EL](#), [Lugo RAB](#), Kross RD, [Villanueva C](#). 2013. Effects of Exercise on Oxidative Stress in Rats Induced by Ozone. *The Scientific World Journal*. 1(3)
 18. Litsgarten MA. 2003. Similarity of Epithelial Relationships in the Gingiva of Rat and Man. *J. Periodontol*. 46 (11): 677-80
 19. Johnson, N. 2001. Tobacco Use and Oral Cancer: A Global Perspective *Journal of Dental Education*. 65(4). P 328-339
 20. Pfeifer G, Denissenko M, Olivier M, Tretyakova N, Hecht S, Hainaut P. 2002. Tobacco Smoke Carcinogens, DNA Damage and p53 Mutations in Smoking-Associated Cancers. *Oncogene*. 21. pp7435-745
 21. Semenzati GO, Salgado BS, Rocha NS, Matheus SMM, Carvalho LR, Martins RHG. 2012. Histological and Immunohistochemical Study of The Expression of p53 and Ki67 Proteins in the Mucosa of the Tongue, Pharynx and Larynx of rats Exposed to Cigarette Smoke. *Inhalation Toxicology*, 24(11). 723-731

-
22. Balansky R. 2007. Differential Carcinogenicity of Cigarette Smoke in Mice Exposed Either Transplacentally, Early in Life or in Adulthood. *Int J Cancer*. 130(5):1001-10
 23. Reddy VM, Saxena S. 2010. Assesment of Ki67 in Healthy, Premalignant, and Malignant Lesion of the Oral Mucosa and It's Predictive Role in Disease Progression. *Int J Oral Med Sci*. 9(2). 67-74
 24. Patel SM, Patel KA, Patel PR, Gamit B, Hathila RN, Gupta S. 2014. Expression of p53 and Ki67 in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma : An Immunohistochemical Study. *International Journal of Medical Science and Public Health*. 3(10). 1201-1204
 25. Leao HZ, Zettler CG, Cambruzzi E, Lammers M, Luz Soster PR, Mello FB, Goulart GR, Campos D, Jotz GP. 2015. The Effect of Passive Smoking on Laryngeal and Tracheal Mucosa in Male Wistar Rats During Growth : An Experimental Study. *Journal of Voice*. 31 (1). 20-23
 26. Ge S, Zhang J, Du Y, Hu B, Zhou Z, Lou J. 2016. Dynamic changes in the gene expression profile during rat oral carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Molecular Medicine Reports*. 13: 2561-2569