

EKSPRESI PROTEIN NM 23-H1 PADA BERBAGAI POLA PERTUMBUHAN KARSINOMA SEL BASAL¹

Meny Hartati,* Kistiandono,* Achmad Tjarta*

ABSTRACT

EXPRESSION OF NM 23-H1 PROTEIN IN VARIOUS GROWTH PATTERN OF BASAL CELL CARCINOMA

Basal cell carcinoma is a commonly reported malignant skin tumor, and occur predominantly in the sun-ray exposed area through some level of oncogenesis process. Classification based on growth pattern consisted of nodular, nodular-infiltrative, infiltrative-sclerosing, infiltrative-non-sclerosing and multifocal growth pattern. Basal cell carcinoma is locally invasive, slowly growing and rarely metastatic. To see the expression of nm 23 gen, a metastatic gene supressor tumor, the products of nm 23-H1 protein, nm 23-H1 monoclonal antibodies was used. The expression of this protein is associated with metastatic potential. Fifty cases of basal cell carcinoma is evaluated in this study. The result showed significant difference of nm 23-H1 protein expression in five basal cell carcinoma growth pattern ($p < 0.01$). In all cases there were 12% cases (6/50) with weak nm 23-H1 expression, 22% (11/50) moderate expression and 66% (33/50) strong expression. It means that 88% of basal cell carcinoma with moderate to strong expression has a low metatatic potential. This support the idea that basal cell carcinoma is a rarely metastasing malignant skin tumors.

Keywords : nm 23-H1 - basal cell carcinoma - growth pattern - metastatis potential.

PENDAHULUAN

Tumor kulit ganas berdasarkan data Badan Registrasi Kanker – Ikatan Ahli Patologi Indonesia (1984) menempati peringkat ke tiga dari 10 jenis kanker terbanyak ditemukan di Indonesia¹. Kanker kulit yang mempunyai frekuensi terbanyak ialah jenis karsinoma sel basal (39,93%) yang paling banyak berlokasi di muka, karsinoma sel skuamosa (39,57%) yang paling banyak berlokasi di kaki dan melanoma maligna (11,44%) yang paling banyak berlokasi di telapak kaki².

Karsinoma Sel Basal (KSB) merupakan tumor kulit ganas yang sering ditemukan dan menunjukkan gambaran histologik yang bervariasi, berasal dari sel pluripoten yang timbul di lapisan basal dari epidermis dan dari selubung akar rambut. Pada tepi kelompok tumor, sel tumor tersusun berderet mirip sel basal epidermis biasa disebut dengan bentuk palisade³. Pada permukaan mukosa tanpa adneksa kulit seperti pada bibir, lidah dan serviks tidak pernah sebagai tempat pertumbuhan tumor primer³. KSB terutama timbul pada daerah yang terpapar sinar matahari

¹ Disajikan pada pertemuan ilmiah bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta 9 Juni 2000.

* Bagian Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

misalnya pada wajah seperti kelopak mata, telinga dan hidung³⁻⁵⁾.

Pola pertumbuhan KSB secara histopatologi dapat dibedakan atas noduler, noduler-infiltratif, infiltratif-sklerosing, infiltratif-non-sklerosing dan multifokal.⁶⁾

Metastasis pada kanker dikenal sebagai sifat biologis yang khas dan merupakan tanda pasti dari keganasan⁶⁻⁸⁾. Invasi adalah proses sel-sel tumor ganas yang tumbuh secara progresif, menginfiltrasi dan merusak jaringan sekitarnya. Pada invasi sel ganas merusak batas jaringan yaitu membran basalis. Mula-mula terjadi sekresi enzim proteolitik menghancurkan komponen matriks, kemudian timbul perlekatan sel tumor ke daerah matriks ekstra-seluler yang telah dihancurkan, selanjutnya menembus matriks ekstraseluler sekitarnya, mencapai pembuluh darah atau pembuluh limfe dan bermetastasis⁷⁻⁸⁾.

Pada invasi terdapat tiga bagian yang terlibat yaitu membran basalis, sel tumor dan sel stroma ditambah semua faktor yang dihasilkan oleh sel itu sendiri. Matriks ekstraseluler dibagi atas 2 golongan besar yaitu membran basalis yang terdiri atas kolagen tipe IV, proteoglikan, protein non-kolagen seperti laminin dan lain-lain, dan jaringan ikat interstisial yang terdiri atas kolagen tipe I dan III, fibrinektin dan proteoglikan^{4,7)}.

KSB/tumor ganas biasanya berkembang melalui karsinogenesis merupakan suatu proses yang kompleks yang dikontrol oleh berbagai protein. Proses ini terjadi karena perubahan genetik sebagai akibat mutasi onkogen dan akumulasi gen supresor tumor (anti-onkogen) sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan pada sel menjadi ganas (transformasi ganas)^{7,8)}.

Gen nm 23 disebut “gen supresor metastasis”, terletak pada kromosom 17q21, memproduksi protein yang menekan proses transisi dari fase G1 ke fase S pada siklus sel. Ada 2 protein yang dihasilkan yaitu protein nm 23-H1 dan nm 23-H2. Protein nm 23-H1 ekspresinya dikaitkan dengan tinggi/rendahnya potensi metastasis. Antara ekspresi protein nm 23-H1 dan potensi metastasis berbanding terbalik yaitu bila ekspresi meningkat maka potensi metastasis makin menurun/rendah. Protein nm 23-H1 bersifat asam, 97% terdiri dari asam amino homolog dengan “nucleoside diphosphate kinase”. Protein nm 23-H2 sampai saat ini peranannya belum diketahui^{5,8-11)}.

Beberapa peneliti melaporkan fungsi potensial supresor dari produk gen nm 23 mempunyai hubungan yang terbalik antara ekspresi protein dengan potensi metastasis pada karsinoma kolorektal, kanker lambung, karsinoma hepatoseluler dan karsinoma mammae duktal¹¹⁻¹⁵⁾. Russell, dkk.¹⁶⁾ dari penelitiannya melaporkan ada hubungan terbalik antara ekspresi nm 23-H1 dengan potensi metastasis pada *cell line* karsinoma payudara mencit. Russell dalam penelitian lainnya menunjukkan, ekspresi protein nm 23-H1 lebih tinggi pada karsinoma payudara yang belum metastasis dibandingkan karsinoma payudara rekuren¹⁶⁾.

KSB bersifat invasif lokal, tumor menyebar secara lambat dan jarang mengalami metastasis²⁻⁴⁾, oleh karena itu perlu diketahui bagaimana ekspresi protein nm 23-H1 pada berbagai pola pertumbuhan KSB. Jawaban sementara/hipotesis terhadap masalah tersebut adalah ekspresi protein nm 23-H1 berbanding terbalik dengan luasnya/jauhnya invasi pada berbagai pola pertumbuhan KSB. Penelitian ini bertujuan untuk menilai

ekspresi protein nm 23-H1 pada berbagai pola pertumbuhan KSB, sehingga dengan mengetahui ekspresi tersebut maka potensi invasi KSB dapat diketahui. Makna penelitian ini adalah dengan mengetahui ekspresi protein nm23-H1 maka luasnya/jauhnya invasi pada berbagai pola pertumbuhan KSB (noduler, noduler infiltratif, infiltratif sklerosing, infiltratif non sklerosing dan multifokal) dapat diketahui. Hal ini kemungkinan dapat dikaitkan dengan kecenderungan potensi metastasis pada berbagai pola pertumbuhan untuk menentukan prognosis penderita KSB lebih baik.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian ini menggunakan 50 kasus KSB dalam bentuk blok parafin dan sediaan HE (dikumpulkan dari arsip bagian Patologi Anatomi FKUI sejak bulan Januari 1996 sampai dengan awal Januari 2000). Selain itu diambil 1 kasus karsinoma payudara yang mempunyai diferensiasi baik yang dipakai sebagai kontrol.¹⁷⁾

Sebelum dilakukan pemotongan blok parafin untuk membuat sediaan imunohistokimia, terlebih dahulu masing-masing sediaan histopatologi (pewarnaan HE) dievaluasi kembali oleh semua peneliti untuk:

1. menentukan berbagai pola pertumbuhan KSB (noduler, noduler infiltratif, infiltratif sklerosing, infiltratif non sklerosing dan multifokal).
2. memilih potongan jaringan yang mengandung cukup komponen tumor, untuk pewarnaan imunohistokimia, bila perlu dibuat pewarnaan HE baru.

Pewarnaan imunohistokimia dengan metode *Avidin-Biotin-Complex* bertujuan untuk mendeteksi protein nm 23-H1 di

dalam sel dengan anti nm 23-H1 dari *clone* 37,6 berasal dari *mouse myeloma* kelas imunoglobulin IgG2a¹⁷⁾. Pulasan dilakukan pada setiap sediaan yang sudah ada potongan jaringan setebal 4--5 mikron untuk semua kasus, selanjutnya dilakukan deparafinisasi dan rehidrasi dalam xylol dan alkohol dengan konsentrasi yang menurun, kemudian dilakukan 2 kali blocking reagensia secara terpisah. Pertama dilakukan blocking peroksidase endogen 0,5% H₂O₂ dalam metanol selama 30 menit kemudian direndam TRS di *microwave*. Selanjutnya dilakukan blocking kedua dengan 3% NHS selama 20 menit. Tujuan reaksi blocking adalah untuk mengurangi pewarnaan latar belakang yang non spesifik. Seterusnya diberi antibodi monoklonal (antibodi primer nm 23-H1 dengan dilusi 1/250). Sesudah dibilas diberi antibodi sekunder (*biotinylated rabbit anti mouse immunoglobulin G*) sebagai penghubung, kemudian sediaan direaksikan dengan kompleks StreptAvidin-Biotin merupakan reagensia pembawa label enzim (yang belum berwarna). Kemudian sediaan dieram dengan larutan substrat enzim (30% H₂O₂ dalam buffer TRIS HCL yang sudah diberi DAB/3,3'-*diamino-benzidine*) sebagai khromogen. Pada pengeraman ini terjadi reaksi enzimatik dimana H₂O₂ akan melepas O₂, dan DAB akan teroksidasi menjadi presipitat yang berwarna coklat. Kemudian dilakukan counterstain dengan Haematoxyllin Mayer's dan Lithium Carbonat secara ringan, di antara tiap tahap dilakukan pencucian dalam PBS 2 kali selama 5 menit dan bila perlu dicuci dengan air mengalir. Tahap akhir dilakukan dehidrasi dalam alkohol bertingkat dan *xylol* kemudian ditutup dengan *deckglass* yang diberi entelan. Pada tiap pulasan disertakan kontrol negatif dan kontrol positif sebagai kontrol teknik pulasan dan standar penilaian¹²⁻²¹⁾.

Penilaian ekspresi protein nm 23-H1 dilakukan pada daerah tumor KSB menurut Lee Cs dkk.²¹⁻²² yang dimodifikasi. Penilaian dilakukan secara semi kuantitatif pada seluruh daerah tumor secara acak oleh 2 peneliti dengan perbedaan intra dan inter observer tidak melebihi 10%²². Ekspresi protein nm 23-H1 terpulas positif pada sitoplasma sel dengan warna coklat dan inti besar berwarna biru cerah.

Untuk penilaian intensitas warna dibuat gradasi sebagai berikut¹⁹⁻²⁰:

1. Ekspresi negatif (0) jika tidak ada warna pada sel tumor.
2. Ekspresi lemah (+1) jika intensitas warna lemah pada sitoplasma sel tumor.
3. Ekspresi sedang (+2) jika intensitas warna sedang dibanding kontrol +/-.
4. Ekspresi kuat (+3) jika intensitas warna kuat dibanding kontrol +/-.

Karena dalam 1 potongan jaringan pada 1 sediaan, terdapat intensitas warna di sitoplasma sel tumor yang heterogen/bervariasi maka dimodifikasi dengan dibuat persentasi pada daerah tumor

tersebut dan kemudian dikalikan dengan intensitas warna menurut gradasi (0 sampai +3). Hasil ditotal dari seluruh jumlah nilai yaitu: gradasi intensitas warna x% daerah tumor.

Kemudian hasil total (gradasi intensitas warna x% daerah tumor) dibedakan menjadi 4 kelompok:¹⁷⁻²⁰

- ekspresi nm 23-H1 negatif antara: 0--20% yaitu dengan jumlah nilai antara 0--60 (nilai 60 diperoleh dari 20% x nilai maksimum yaitu 300).
- ekspresi lemah antara: >20--40% dengan jumlah nilai antara 61--120.
- ekspresi sedang antara: >40--60% dengan jumlah nilai antara 121--180.
- ekspresi kuat >60% dengan jumlah nilai antara 181--300.

HASIL

Lima puluh kasus sediaan HE dari berbagai pola pertumbuhan dievaluasi kembali. Hasil disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Histopatologi dari 50 Kasus Pada Berbagai Pola Pertumbuhan Karsinoma Sel Basal.

Pola pertumbuhan KSB					
N kasus	Noduler	Nod-Infiltratif	Inf-Sklerosing	Inf-Non-Skler	Multifokal
50	5	9	12	17	7

Ekspresi protein nm 23-H1 pada seluruh pola pertumbuhan KSB diuji

dengan uji statistik Kruskal Wallis²²⁻²³ disajikan pada Tabel 2.

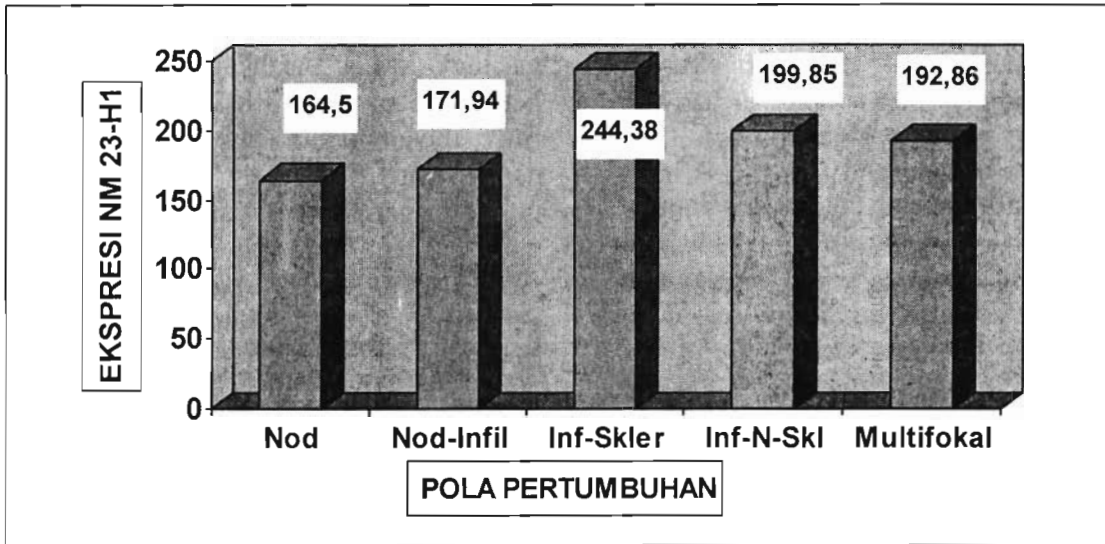
Tabel 2. Ekspresi Protein nm 23-H1 Terhadap Berbagai Pola Pertumbuhan Karsinoma Sel Basal dengan Uji Kruskal Wallis.

Ekspresi nm 23 -H1	Pola Pertumbuhan KSB				
	Noduler	Nod-Infiltr	Inf-Skleros	Infil-N-Sklers	Multifokal
N Kasus	5	9	12	17	7
T Ekspresi	822,50	1547,46	2932,50	3397,50	1350,00
Mean Rank	17,90	18,78	37,46	24,56	21,36

h hitung > h tabel → 17,98 > 13,30 → p < 0,01. SD = 1,04.

Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan ekspresi protein nm 23-H1 yang bermakna ($p < 0,01$) pada semua kelompok pola pertumbuhan KSB.

Rata-rata ekspresi protein nm 23-H1 pada berbagai pola pertumbuhan karsinoma sel basal dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Nilai Rata-rata Ekspresi nm 23-H1 pada Berbagai Pola Pertumbuhan KSB.

Tabel 3. Sebaran Ekspresi Protein nm 23-H1 pada Berbagai Pola Pertumbuhan Karsinoma Sel Basal.

Pola pertumbuhan Karsinoma Sel Basal	Ekspresi			Jumlah Kasus
	Lemah	Sedang	Kuat	
Noduler	2	0	3	5
Noduler Infiltratif	3	1	5	9
Infiltratif Sklerosing	0	2	10	12
Infil Non Sklerosing	1	5	11	17
Multifokal	0	3	4	7
Total	6	11	33	50

Dari 50 kasus, terdapat ekspresi lemah 12% (6/50) kasus, sedangkan 22% (11/50) merupakan tumor dengan ekspresi sedang dan 66% (33/50) dengan ekspresi kuat.

Pada 40% (2/5) pola pertumbuhan noduler, 33,33% (3/9) noduler infiltratif dan 5,9% (1/17) infiltratif non sklerosing terdapat ekspresi nm 23-H1 yang lemah, sedangkan pada 11,11% (1/9) pola

pertumbuhan noduler infiltratif, 16,67% (2/12) infiltratif sklerosing, 29,41% (5/17) infiltratif non sklerosing dan 42,86% (3/7) multifokal mempunyai ekspresi yang sedang. Ekspresi yang kuat terdapat pada 60% (3/5) pola pertumbuhan noduler, 55,56% (5/9) noduler infiltratif, 83,33% (10/12) infiltratif sklerosing, 64,70% (11/17) infiltratif non sklerosing dan 57,14% (4/7) multifokal.

PEMBAHASAN

Untuk menilai tinggi rendahnya potensi metastasis digunakan ekspresi protein nm 23-H1 yang dihasilkan oleh gen nm 23 di inti sel yang merupakan gen supresor metastasis sebagai tolok ukur dari potensi metastasis^{7-15,17-20}. Campo dkk.¹¹) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa delesi alel pada khromosom 17 berhubungan dengan progresivitas karsinoma kolorektal, dan gen nm 23 juga terletak pada kromosom 17q21.3-22 yang disebut sebagai suatu gen supresor metastasis.

Pada penelitian ini, 40% pola pertumbuhan noduler dan 33,33% (3/9) noduler infiltratif mempunyai ekspresi lemah yang berarti cenderung berpotensi metastasis tinggi, karena kedua pola tersebut masih mungkin untuk berinfiltrasi lebih lanjut.

Pada pola pertumbuhan infiltratif sklerosing dan multifokal pada semua kasus (100%) mempunyai ekspresi sedang sampai kuat sebesar dan pada pola infiltratif-non-sklerosing 94,11%. Ini berarti bahwa hampir semua kasus (88%) karsinoma sel basal cenderung berpotensi metastasis rendah, karena ekspresi onkoprotein nm 23-H1 pada umumnya tinggi sehingga dapat diduga anti onkogen nm 23-H1 belum mengalami mutasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Yamaguchi¹⁴) pada 25 kasus hepatocellular carcinoma yang menyimpulkan ada kaitan antara ekspresi protein nm 23-H1 yang rendah dengan buruknya prognosis sejumlah kanker yang bermetastasis. Begitu juga penelitian yang dilakukan Koder¹³) pada kanker lambung menyimpulkan bahwa regulasi yang menurun dari gen nm 23 mempunyai peran dalam metastasis dan invasi yang berkaitan dengan prognosis

jelek. Ekspresi protein yang rendah pada infiltrating karsinoma payudara duktal berkorelasi dengan berkurangnya kemampuan daya hidup pasien.^{15,19)}

Dalam penelitian ini ditemukan ekspresi yang bervariasi di antara masing-masing kasus, bahkan terlihat juga heterogenitas antar sel. Pengamatan lebih rinci menunjukkan ekspresi nm 23-H1 dengan intensitas kuat terdapat pada sel tumor dengan inti berukuran besar. Dengan uji Kruskal Wallis ditemukan ekspresi protein nm 23-H1 pada semua pola pertumbuhan KSB berbeda bermakna ($p < 0,01$).

Dari uji tersebut terlihat (Gambar 1) bahwa pola pertumbuhan noduler dan noduler infiltratif cenderung berpotensi metastasis tinggi (rata-rata ekspresi nm 23-H1 sebesar 164,50 dan 171,94) sedangkan pola pertumbuhan infiltratif sklerosing, infiltratif non sklerosing dan multifokal rata-rata ekspresi lebih dari 180 (ekspresi sedang sampai kuat) cenderung berpotensi metastasis rendah. Seperti dalam penelitian yang dilakukan oleh Hayashi dkk.¹²), 17 dari 24 pasien kolorektal terdapat 16 pasien dengan ekspresi rendah yang artinya berpotensi metastasis tinggi, hanya 1 pasien tidak bermetastasis. Penelitian ini menyimpulkan ekspresi protein nm 23-H1 mempunyai hubungan terbalik dengan potensi metastasis pada kanker kolorektal.

Dari 50 kasus KSB pada penelitian ini terdapat 44 kasus cenderung berpotensi metastasis rendah, salah satu penyebabnya mungkin karena adanya stroma yang sangat penting tidak hanya sebagai induksi timbulnya KSB tetapi juga untuk kehidupan lebih lanjut dari KSB. Telah dibuktikan pada penelitian eksperimental terhadap binatang yang diinduksi KSB beserta stromanya, ternyata tumor tersebut

hidup. Penelitian lain yang dilakukan secara kultur *in vitro*, ternyata sel KSB tanpa stroma tersebut berdiferensiasi menuju keratinosit dan mengalami stratifikasi epitel skuamosa. Disimpulkan bahwa tanpa adanya stroma sebagai media pertumbuhan KSB, maka KSB tidak akan hidup.

Kolagen merupakan protein yang berperan juga dalam perjalanan KSB, yaitu tipe I dan III pada jaringan ikat interstisial serta tipe IV pada membran basalis. Sel tumor melekat pada laminin dan kolagen tipe IV melalui reseptor laminin yang terdapat pada sel tumor. Kolagen tipe IV adalah komponen utama membran basal, memiliki struktur molekul saling berhubungan yang menyerupai jala, dan berfungsi sebagai tempat perlekatan sel-sel epitel yang ada di atasnya dan mungkin juga stroma yang ada di bawahnya.

Sel tumor mengeluarkan sejumlah besar enzim proteolitik dengan aktivitas menghancurkan matriks ekstraseluler seperti kolagenase tipe IV untuk kolagen IV pada membran basal, dan kolagenase tipe I dan III untuk menghancurkan kolagen tipe I dan III pada jaringan interstisial.

Padahal 3 tipe kolagen tersebut berfungsi meningkatkan agresivitas *desmoplastic* KSB, tipe I dan III berperan dalam pembentukan stroma dan tipe IV mempengaruhi invasi tumor. Oleh karena itu KSB jarang bermetastasis sebab mengganggu pembentukan stroma dan membran basal berfungsi sebagai barier yang selektif. Proses degradasi kolagen merupakan titik kritis peralihan pertumbuhan invasif lokal menjadi metastasis^{2,5)}.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekspresi protein nm 23-H1 pada

umumnya tinggi yang berarti cenderung berpotensi metastasis KSB rendah. Dapat diduga bahwa anti onkogen nm 23-H1 belum mengalami mutasi. Dalam kepustakaan^{2,5)} dikatakan bahwa pada tiap tumor menunjukkan perubahan genetik berganda meliputi aktivasi beberapa onkogen dan tidak aktifnya dua atau lebih anti-onkogen. Tiap perubahan mewakili tiap tahap progresi dari sel normal ke sel tumor ganas yang invasif⁵⁻⁷⁾. Sebagai contoh ialah terbentuknya karsinoma kolon melalui beberapa seri perubahan morfologis yang terdiri dari hiperplasi epitel kolon, diikuti terbentuknya adenoma yang membesar progresif dan akhirnya terjadi transformasi ganas. Dalam hal ini inaktivasi anti-onkogen APC timbul lebih dahulu, diikuti oleh aktivasi gen ras dan terakhir hilangnya atau mutasi gen DCC dan p53⁵⁾. Mutasi gen supresor tumor p53 merupakan perubahan gen yang banyak dijumpai pada keganasan. Untuk itu perlu diteliti juga bagaimana kondisi anti onkogen p53 pada KSB apakah sudah mengalami mutasi atau belum.

Hasil ini mendukung pendapat dari kepustakaan sebelumnya²⁻⁵⁾ bahwa karsinoma sel basal merupakan tumor ganas kulit yang jarang mengalami metastasis.

KESIMPULAN

Karsinoma sel basal dengan pola pertumbuhan infiltratif sklerosing, infiltratif non sklerosing dan multifokal mempunyai ekspresi protein nm 23-H1 yang tinggi berarti terjadi invasi yang tidak luas/jauh atau cenderung tidak bermetastasis, sedangkan dengan pola noduler dan noduler infiltratif mempunyai ekspresi protein nm 23-H1 yang rendah kemungkinan terjadi invasi lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Para peneliti mengucapkan terima kasih kepada Menteri Negara Riset dan Teknologi yang melalui kerjasama antara Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dengan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman telah memberikan dana untuk penelitian lewat proyek Riset Pembinaan Iptek Kedokteran IV tahap ke-1 tahun 1999/2000.

DAFTAR RUJUKAN

- Direktorat Jenderal Pelayanan Medik Departemen Kesehatan RI, Badan Registrasi Kanker Ikatan Ahli Patologi Indonesia–Yayasan Kanker Indonesia. Kanker di Indonesia tahun 1989, data histopatologik.
- Tjarta A., Kanoko M. (1998). Pemeriksaan Patologi Anatomi Pada Penelitian Kanker Kulit Multisenter. *Majalah Patologi Indonesia*, 7 (1,2,3) : 28–32.
- Lang PG, Maize JC. (1991). Basal cell carcinoma. Dalam: Friedman RJ, Rigel DS, Kofit AW, Harris MN, Baker D. *Cancer of The Skin*. Philadelphia: WB Saunders Company, 35–73.
- Seldom REJ. Helwig E., Sobin LH, Tortoni H. (1974). *Histological Typing of skin tumours*. WHO Geneva.
- Sloan JP. (1977). The value typing basal cell carcinoma in predicting recurrence after surgical exision. *Br.J. Dermatol.*, 96:127–32.
- Cotran RS. (1998). Neoplasma. Dalam: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, eds. *Robbins. Pathology Basic 6th ed.* Philadelphia: WB Saunders Company, 133–74.
- Poste G., Fidler IJ. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283:139- 46.
- Bernstein LR. Liota LA. (1994). Molecular mediator of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. *Curr Op Oncol.*, 6: 106–13.
- Arnold JL. (1995). Tumor supresor gen. Dalam Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, ed. *The Molecular Basis of Cancer*. Philadelphia: WB Saunders Company, 233–42.
- Giannieri E., Alderisio M., Valli C., Vecchione A., et.al. (1995). Overexpression of NDP Kinase nm 23 associated with ploidy image analysis in colorectal cancer. *Anticancer –Res.*, 15 (5B):2049–53.
- MacDonald NJ., Rosa A., Steeg PS. (1995). The potential roles of nm 23 in cancer metastasis and cellular differentiation. *J Cancer*, 31A(7-8):1096–100.
- Campo E., Miquel R., Jares P., Bosch F., Juan M., Leone A., et.al. (1994). Prognostic significance of the loss of heterozygosity of nm 23-H1 and p 53 Gene in human colorectal carcinoma. *Cancer*, 73:2913–21.
- Hayashi I., Masuda H. (1994). Expression Of m-RNA of nm 23-H1 in human colorectal cancer. *J Med.*, 36:165–73.
- Kodera Y., Isobe KI., Yamauchi M., Kondoh K., Kimura N., Akiyoma S. (1994). Expression of nm 23-H1 RNA levels in human gastric cancer tissue. *Cancer*, 73:259–65.
- Yamaguchi A., Urano T., Goi T., Takeuchi K., Niimoto S., et.al. (1994). Expression of human nm 23-H1 and nm 23 H-2 proteins in hepatocellular carcinoma.
- Russell RL., Geisinger KR., Metha RR., White WL., Shelton B., Kute TE. (1997). Nm23-Relationship to the metastatic potential of breast carcinoma cell lines, primary human xenografts, and lymph node negative breast carcinoma patients. *Am Cancer Soc.*, 1158–65.
- Horne CHW. (1999). Immunodiagnostic nm 23 protein. Dalam: *Biomedical research and histopathology*. Claremont: Novocastra Lab.
- Saitoh K., Takahashi H., Yamamoto M., Kishi H., Parsons PG. (1996). Expression of metastasis suppressor gene product, nm 23 protein, is not inversely correlated with the tumor progression in human malignant melanomas. *Histopathology*, 29:497–505.
- Lee CS., Redshaw A., Boag G. (1996). Nm 23-H1 protein immunoreactivity in laryngeal carcinoma. *Am Cancer Soc.*, 2246–50.
- Barnes R., Masood S., Barker E., Rosengard AM., Coggin DL., et.al. (1991). Low nm 23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlated with reduced patient survival. *Am J Path.*, 139 (2):245–50.
- Mandai M., Konishi I., Koshiyama M., Komatsu T., Yamamoto S., et.al. (1995). Altered expression of nm 23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*, 75:2523–29.
- Sprent P. (1991). *Metode statistik nonparametrik terapan*. Ed.1. Alih bahasa: Osman ER, Rudiansyah. Cetakan pertama Jakarta, Penerbit Universitas Indonesia (UI–Press).
- Sastroasmoro S., Ismael S. (1995). *Dasar-dasar metodologi penelitian klinis, edisi pertama*. Jakarta: Binarupa Aksara.