

**HUBUNGAN ANTARA PENINGKATAN
EKSPRESI LATEN MEMBRANE PROTEIN-1 DAN P53
TERHADAP
STADIUM KLINIS KARSINOMA NASOFARING**

**Oleh
Kartika Sudrajat B.S
131421090502**

**TESIS
Untuk memenuhi salah satu syarat
Guna memperoleh Gelar Dokter Spesialis-1
Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok-Bedah Kepala Leher**



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
ILMU KESEHATAN TELINGA HIDUNG TENGGOROK –
BEDAH KEPALA LEHER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS PADJADJARAN
BANDUNG
2014**

**HUBUNGAN ANTARA PENINGKATAN EKSPRESI
LATEN MEMBRANE PROTEIN-1 DAN p53 DENGAN
STADIUM KLINIS KARSINOMA NASOFARING**

**Kartika Sudrajat
NPM 131421090502**

TESIS

**Untuk memenuhi salah satu syarat
Guna Memperoleh Gelar Dokter Spesialis-1
Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala Leher**

**Telah disetujui oleh Tim Pembimbing pada tanggal
Seperti tertera di bawah ini**

Bandung, Oktober 2014

**Tonny Basriyadi, dr., Mkes. Sp.THT-KL(K)
Ketua Tim Pembimbing**

**Yussy Afriani Dewi dr., MKes. Sp.THT-KL(K)
Anggota Tim Pembimbing**

**HUBUNGAN ANTARA PENINGKATAN
EKSPRESI LATEN MEMBRANE PROTEIN-1 DAN P53 TERHADAP
STADIUM KLINIS KARSINOMA NASOFARING**

Oleh
Kartika Sudrajat
131421090502

TESIS

Untuk memenuhi salah satu syarat
Guna Memperoleh Gelar Dokter Spesialis-1
Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala Leher

Telah disetujui oleh Tim Pembimbing pada tanggal
Seperti tertera di bawah ini

Bandung, Oktober 2014

Tonny Basriyadi, dr., Mkes. Sp.THT-KL (K)
Ketua Tim Pembimbing

Yussy Afriani Dewi dr., MKes, Sp.THT-KL(K)
Anggota Tim Pembimbing

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik (sarjana, magister dan atau doktor), baik di Universitas Padjadjaran maupun perguruan tinggi lain.
2. Karya tulis ini murni gagasan, rumusan, dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing.
3. Dalam karya tulis ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan dicantumkan sebagai acuan dalam naskah dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar pustaka.
4. Pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya dan apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh karena karya tulis ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi ini.

Bandung, Oktober 2014
Yang membuat pernyataan

Kartika Sudrajat Budi
131421090502

DAFTAR SINGKATAN

AJCC	: American Joint Committee on Cancer
AP	: Activator Protein
BCL-2	: B Cell Lymphoma -2
CT scan	: Computerized Tomographic scanning
CD	: Cluster of Differentiation
CTAR	: C-Terminal Activating Region
DNA	: Dioxyribo Nucleid Acid
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
EBNA	: Epstein Barr Virus Nuclear Antigen
EBER	: Epstein Barr Virus Encoded RNAs
EA	: Early Antigen
HRP	: Horse Radish Peroxidase
HLA	: Human Leucocyte Antigen
Ig G	: Imunoglobulin G
Ig A	: Imunoglobulin A
IHC	: Imunihistokimia
JAK	: Janus kinase
JNK	: c-Jun N Terminal Kinase
KNF	: Karsinoma Nasofaring
LMP 1	: Latent Membrane Protein 1
MHC	: Major Histocompability Antigen
MAPK	: Mitogen-activated Protein Kinase
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
NF- κ B	: Natural factor – κ B
NDMA	: Nitrosodimethyamine
NPYR	: N-nitrospyrolididene
NPIP	: Nitrospiperidine
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PET	: Positron emission tomography (PET)

RIP	: Receptor interacting protein kinase
STAT	: Signal Transducer and Activator of transcription
TSG	: Tumor Suppressor Genes
TRADD	: TNFR associated death domain
TRAFs	: Tumor Necrosis Factor-Associated Factors
TNFR	: Tumor Necrosis Reseptor Faktor
UICC	: Union Internationale Center Cancer
VCA	: Viral Capsid Antigen
VEB	: Virus Epstein Barr
WHO	: World Health Organization

ABSTRAK

Karsinoma nasofaring merupakan tumor ganas kepala dan leher yang berasal dari sel epitel nasofaring, predileksi paling sering pada fossa rosenmuler dan kebanyakan penderita datang dengan stadium lanjut. Infeksi Virus Epstein-Barr berperan penting dalam terjadinya KNF dengan mengekspresikan *Latent membrane protein-1* (LMP-1) sebagai onkogen penyebab transformasi sel utama, diantaranya mencegah apoptosis yang dimediasi P53 sehingga terjadi proliferasi sel berlebihan, menyebabkan pembesaran massa tumor yang berhubungan dengan stadium klinis KNF. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 terhadap stadium klinis penderita KNF.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik korelasional dengan rancangan studi silang. Penelitian dilakukan di Bagian THT-KL dan Bagian Patologi Anatomi Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung mulai bulan Juli sampai dengan Agustus 2014. Penelitian dilakukan menggunakan 23 buah data sekunder rekam medis dan blok parafin patologi anatomi penderita karsinoma nasofaring yang dilakukan pemeriksaan imunohistokimia LMP-1 dan P53.

Penelitian ini diikuti oleh 23 subjek (14 laki-laki dan 9 wanita) yang kemudian dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dari blok parafin karsinoma nasofaring. Didapatkan hasil histoskor ekspresi LMP-1 terhadap stadium klinis adalah positif kuat dengan $p = 0,043$ dan hasil histoskor p53 terhadap stadium klinis adalah positif kuat dengan $p = 0,013$. Ekspresi LMP-1 dan P53 berhubungan bermakna terhadap stadium klinis dengan menggunakan analisis regresi ganda ($F=11,727$, $p=0,000$).

Kesimpulan : Peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 berhubungan dengan tingkatan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Kata Kunci : Karsinoma nasofaring, LMP-1, P53, stadium klinis

ABSTRACT

Nasopharyngeal carcinoma is head and neck cancer which originated from nasopharyngeal epithelial cell, predilection site commonly at rosenmuller fossa and most of patient came with advanced stage. Epstein barr virus infection had an important role in NPC pathogenesis by the expression of latent membrane protein-1 (LMP-1) as an oncogen causing major cell transformation, results in apoptotic inhibition mediated by P53. This will lead to cells overproliferation and causing tumor mass enlargement which related with clinical staging of NPC.

This study is a cross sectional observational and correlational analitic study. This study heald in ORL-HNS Departement and Anatomical Pathology Departement of Hasan Sadikin Hospital Bandung from Juni until August 2014. 23 secondary data from medical record was used and tissue parafin block of NPC patient was performed imunohistochemistry examination from tissue parafin block.

There was strong positive correlation between histoscore LMP-1 expresion with clinical staging ($p=0,043$) and also between histoscore P53 with clinical staging ($p=0,013$). LMP-1 and P53 expresion had significant correlation with clinical staging using double regression analysis ($F=11,727$, $p=0,000$)

Conclusion : there was significant correlation between increased LMP-1 and P53 expresion with clinical staging of nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma, LMP-1, P53, clicical staging.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, karunia dan petunjuk-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu persyaratan untuk menyelesaikan Program Dokter Spesialis Bidang Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher dan Pendidikan Pascasarjana Ilmu Kedokteran Dasar di Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RS Dr. Hasan Sadikin Bandung.

Judul tesis ini dipilih karena insidensi karsinoma nasofaring (KNF) ditemukan cukup tinggi dan penderita yang datang berobat sudah dalam stadium lanjut, dikarenakan gejala dini yang tidak khas dan lokasi nasofaring yang tersembunyi. Diagnosis dengan stadium klinis yang tepat menentukan keberhasilan penatalaksanaan. Penelitian serologi KNF cukup banyak, diantaranya mengenai LMP-1 yang merupakan onkogen dan p53 yang menyebabkan apoptosis. Untuk itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai hubungan peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Semoga hasil penelitian ini dapat memberikan informasi tambahan yang berguna bagi klinisi dan sejawat dokter spesialis Ilmu Kesehatan THT-KL.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dorongan semangat, serta sumbangan pikiran banyak pihak, maka tesis ini tidak dapat diselesaikan.

Dengan segala kerendahan hati dan rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih yang tulus dan sebesar-besarnya kepada :

- Prof. Dr. Ir. Ganjar Kurnia, DEA sebagai Rektor Universitas Padjadjaran dan beserta pembantu rektor yang telah mengizinkan penulis mengikuti Program Dokter Spesialis Bidang Ilmu Kesehatan THT-KL di Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RS Dr. Hasan Sadikin Bandung.
- Prof. Dr. med. Tri Hanggono Achmad, dr., sebagai Dekan Fakultas Kedokteran beserta para pembantu dekan yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Pendidikan Spesialis kepada penulis.
- Dr. Dwi Prasetyo, dr., SpA(K) sebagai Ketua Tim Koordinasi Program Pendidikan Dokter Spesialis I dan Prof. H. Herry Garna, dr., SpA(K), Phd, sebagai Ketua Tim Koordinasi Program Pendidikan Dokter Spesialis I yang lama yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program pendidikan dokter spesialis kepada penulis.
- H. Bayu Wahyudi, dr., SpOG, MPH M sebagai Direktur Utama dan seluruh staf RS Dr. Hasan Sadikin Bandung yang telah berkenan menerima penulis untuk belajar dan turut mengabdikan di lingkungan rumah sakit ini.
- Dr. Ratna Anggraeni A. dr., MKes., Sp. THT-KL(K) sebagai Kepala Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti Program Pendidikan Spesialis, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dukungan, dorongan, bimbingan, petunjuk, serta kesabaran

kepada penulis sejak awal hingga penyelesaian tesis ini.

- Prof. Dr. Teti H.S. Madiadipoera, dr., Sp THT-KL(KAI), FAAAAI sebagai guru besar dan Kepala Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS sebelumnya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti Program Pendidikan Spesialis, memberikan bimbingan, dorongan, nasehat, serta petunjuk sejak penulis memulai pendidikan hingga saat ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dukungan, dorongan, bimbingan, petunjuk, serta kesabaran kepada penulis sejak awal hingga penyelesaian tesis ini.
- Prof. Dr. M. Thaufiq Boesoerie, dr, MS, SpTHT-KL (K), sebagai guru besar di bagian THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS, yang telah memberikan bimbingan, pembelajaran keterampilan operasi, semangat dan kesempatan penulis untuk menempuh program pendidikan spesialis ini.
- Prof. Dr. H. Iwin Sumarman, dr., SpTHT-KL(KAI-KRn) sebagai guru besar di bagian THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala dukungan, dorongan, bimbingan, semangat serta kesabaran kepada penulis sejak awal penulis diterima di bagian THT-KL hingga penyelesaian tesis ini.
- Bambang Purwanto, dr., M.M., SP THT-KL(K) sebagai Ketua Program Studi Pendidikan Spesialis I Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Universitas Padjadjaran/RSHS sebelumnya dan selaku Ketua Bidang Kajian Utama PPCD Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Universitas Padjadjaran/RSHS yang telah membimbing, memberikan keterampilan, dan nasehat selama penulis

mengikuti pendidikan.

- Dr. Wijana, dr., SpTHT-KL(K) sebagai Ketua Program Studi Pendidikan Spesialis I Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Universitas Padjadjaran/RSHS, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala dukungan, dorongan, bimbingan, serta kesabaran kepada penulis sejak awal hingga penyelesaian tesis ini.
- Tonny B. Sarbini , dr., M.Kes., SpTHT-KL(K) sebagai Pembimbing I PPDS. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala dukungan, dorongan, bimbingan, serta kesabaran kepada penulis sejak awal hingga penyelesaian tesis ini.
- Yussy Afriani Dewi, dr., M.Kes., SpTHT-KL(K) sebagai Pembimbing II PPDS. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala dukungan, dorongan, bimbingan, serta kesabaran kepada penulis sejak awal hingga penyelesaian tesis ini. Juga untuk kesempatan pembelajaran di meja operasi yang memberikan bimbingan, motivasi serta kepercayaan kepada penulis untuk belajar dan menggali keterampilan operasi sebanyak-banyaknya selama proses pendidikan.
- Seluruh staf pengajar Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS, Prof. Hj. Surimah Surchman. dr., Sp.THT-KL(K)(alm), Dindy Samiadi, dr., Sp.THT-KL(K)., FAAOHNS, Bogi Soeseno, dr., Sp.THT-KL(K), Nur Akbar Aroeman, dr., Sp.THT-KL(K), dr. Ongka M. Saifuddin Sp.THT-KL(K), Lina Lasminingrum, dr., M. Kes., Sp.THT-KL(K),

Sintasari Ratunanda, dr., M. Kes., Sp.THT-KL(K), Melati Sudiro, dr., M. Kes., Sp.THT-KL(K), Arif Dermawan, dr., M. Kes., Sp.THT-KL(K), Denese MS Rully, dr., M. Kes., Sp.THT-KL, Shinta Fitri Boesoirie, dr., M. Kes., Sp.THT-KL(K), Agung Dinasti Permana, dr.,M.Kes., Sp.THT-KL, dan Sally Mahdiani, dr., M.Kes., Sp.THT-KL ,yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, pengajaran, dan dukungan selama mengikuti Pendidikan.

- Bethy S. Hernowo, dr., Sp PA(K)., Phd., sebagai Kepala Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RSHS, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala dukungan, dan bimbingan kepada penulis, dimana diberikan kesempatan untuk melakukan pemeriksaan imunohitokimia untuk penelitian ini sejak awal hingga penyelesaian tesis ini.
- Dr. Hadyana Sukandar, Drs., MSc yang telah memberikan arahan dan petunjuk dalam pembuatan desain dan analisis statistik penelitian ini.
- Rekan seperjuangan dr. Yuwan Pradana, dr. Bima Mandraguna, dr. Mukhlis Imanto, dr. Lussie Rachmawati, dr. Akun Wahyudi, dr. Yuliet Tamus, yang telah bersama sejak awal hingga akhir pendidikan selalu memberikan dukungan dan kerjasama yang baik serta kenangan manis yang tak terlupakan.
- Seluruh sejawat senior yang selama pendidikan telah memberikan bimbingan, teladan, semangat dan kesempatan kepada penulis untuk belajar dan bekerja
- Seluruh teman-teman residen yang telah memberikan dukungan, doa dan persahabatan pada penulis dalam menyusun tesis ini dan selama proses pendidikan.

- Seluruh karyawan dan perawat Poliklinik, kamar operasi serta ruang rawat inap Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung serta seluruh perawat dan karyawan RS. Dr. Hasan Sadikin di Lt V Kemuning, OK COT LT.3, OK COT LT.4, Kemuning Lt.5 dan R. Pemulihan yang telah membantu dan bekerjasama dengan penulis selama pendidikan ini.
- Seluruh staf pengajar dan karyawan RS. Dustira, RS. Ujung berung dan RS. Waled Cirebon yang telah memberikan kesempatan untuk belajar, bekerja, dan mengabdikan ilmu selama penulis menjalankan pendidikan dokter spesialis ini.
- Rasa hormat, cinta dan terimakasih setulus-tulusnya kepada Ayah dan Ibuku tercinta, Kapten Czi I. Oneng Toemiran dan Ibu Suharni serta mertuaku tercinta Bapak H. Ir. Soekistiarso Dipl.HE dan Ibu Hj. Lekia Surya SH yang telah sangat berjasa mengantarkan penulis menjalani pendidikan Dokter Spesialis, begitu banyak doa yang tercurah, dorongan semangat, bantuan dan kasih sayang yang diberikan.
- Isteriku tercinta Vidya Dewi Anggraini, dr yang senantiasa mendukung, mendampingi dalam suka dan duka, memberikan pengorbanan yang besar, perhatian, doa, semangat dan tempat keluh kesah segala kesulitan serta hambatan, tak cukup untaian kata untuk mengungkapkan rasa cinta dan terimakasih yang telah diberikan.
- Anak-anakku tercinta, Zhafira Syari Huwaida dan Aisha Putri Humaira, terimakasih atas kebahagiaan yang telah kalian bawa kedalam kehidupan ayah. Maafkan ayah atas kurangnya waktu untuk bersama kalian. Semoga

Zhafira dan Aisha menjadi anak-anak solehah yang sukses di dunia dan akhirat. Amin

- Kepada kakak, Tante, Om dan ipar serta adik-adik tercinta, yang selalu memberikan bantuan dan dorongan selama penulis menjalani pendidikan dan menyelesaikan tesis ini.
- Kepada seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama pendidikan Dokter Spesialis ini dan penulisan tesis ini.

Semoga penelitian ini dapat memberikan banyak manfaat bagi kita semua dan kiranya Allah SWT akan membalas dengan kebaikan. Amin.

Bandung, Oktober 2014

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL.....	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Kegunaan Penelitian	6
1.4.1 Kegunaan Ilmiah	6
1.4.2 Kegunaan Praktis	7
 BAB II KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN, DAN HIPOTESIS	
2.1 Kajian Pustaka	8
2.1.1 Karsinoma Nasofaring	8

2.1.2	Faktor Resiko Kanker Nasofaring	8
2.1.2.1	Faktor Lingkungan	8
2.1.2.2	Faktor Genetik	9
2.1.2.3	Infeksi Virus Epstein Barr	10
2.1.3	Anatomi Nasofaring	10
2.1.4	Histopatologi	11
2.1.5	Stadium Klinis	11
2.1.6	Gambaran Klinis	12
2.1.7	Diagnosis.....	14
2.1.7.1	Pemeriksaan Nasofaring	15
2.1.7.2	Pemeriksaan Radiologi.	15
2.1.7.3	Pemeriksaan Patologi.....	15
a.	Biopsi aspirasi jarum halus	15
b.	Biopsi	16
c.	Serologi	16
2.2	Virus Epstein Barr.....	17
2.2.1	Fase Lisis.....	20
2.2.2	Fase Laten.....	21
2.2.3	Latent Protein Membrane-1 (LMP1)	22
2.3	P53.....	27
2.4	Kerangka Pemikiran.....	31
2.5	Hipotesis	35

BAB III BAHAN, SUBJEK, ALAT DAN METODE PENELITIAN

3.1	Subjek dan Alat Penelitian.....	36
3.1.1	Subjek Penelitian ...	36
3.1.1.1	Kriteria Inklusi.....	36
3.1.1.2	Kriteria Eksklusi ...	36
3.1.1.3	Besar Sampel ...	37
3.1.2	Bahan dan Alat Yang Digunakan Penelitian.....	37
3.1.2.1	Bahan Penelitian ...	37
3.1.2.2	Alat Penelitian ...	38
3.2	Metode Penelitian ...	38
3.2.1	Rancangan Penelitian ...	38
3.2.2	Identifikasi Variabel.....	38
3.2.2.1	Variabel Penelitian.....	38
3.2.2.2	Definisi Operasional ...	39
3.2.3	Alur Kerja dan Teknik Pengumpulan Data. ...	43
3.2.3.1	Alur Kerja ...	44
3.2.3.2	Prosedur Pembuatan Pulasan Imunohistokimia LMP-1 dan p53.....	44
3.2.3.3	Teknik Pengumpulan Data.....	45
3.2.3.4	Evaluasi Hasil Pulasan Imunohistokimia LMP-1 dan p53.....	46
3.2.4	Rancangan Analisis.....	46
3.2.5	Waktu dan Tempat Penelitian.....	47

3.3	Aspek Etik Penelitian.....	47
-----	----------------------------	----

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Hasil Penelitian.dan Pembahasan.....	49
4.1.1	Karakteristik Subjek Penelitian.....	49
4.1.2	Hasil Pemeriksaan Ekspresi LMP-1 dan p53 pada Penderita Karsinoma Nasofaring	50
4.1.3	Perbandingan Histoskor LMP -1, p53 Berdasarkan Stadium Klinis.....	52
4.1.4	Hubungan Antara Histoskor LMP-1 dan p53 dengan Stadium Klinis Berdasarkan Analisis regresi ganda.....	53
4.2	Pembahasan.....	54
4.3	Uji Hipotesis.....	61

BAB V	SIMPULAN DAN SARAN.....	63
--------------	--------------------------------	-----------

DAFTAR PUSTAKA.....	64
----------------------------	-----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Infeksi virus Epstein Barr pada pembawa virus yang sehat.....	19
2.2 Infeksi Primer dan persisten Virus Epstein Barr	22
2.3 Jalur sinyal LMP1 pada karsinogenesis KNF.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Surat Keputusan Komite Etik Penelitian
2. Informasi Penelitian
3. Surat Pernyataan Persetujuan Ikut Penelitian
4. Status Penelitian
5. Tabel Data Hasil Penelitian

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan tumor ganas kepala dan leher yang berasal dari sel epitel nasofaring, predileksi paling sering pada fossa rosenmuler dengan gejala yang tidak khas atau tanpa gejala sehingga kebanyakan penderita datang dengan stadium lanjut (stadium III atau IV).¹⁻⁴

Insidensi KNF yang paling tinggi ditemukan di daerah China Selatan, dengan frekuensi 100 kali dibandingkan pada ras Kaukasia. Insidensi KNF cukup tinggi di Provinsi Guangdong China Selatan yaitu 17,8/100.000 penduduk dan merupakan daerah endemis karsinoma nasofaring. Karsinoma nasofaring jarang terjadi pada beberapa daerah tertentu, seperti Amerika Utara atau Eropa, insidensinya kurang dari 1 per 100.000 penduduk. Insidensi KNF di Asia

Tenggara seperti Singapura 15 per 100.000 penduduk, Malaysia 9,7 per 100.000 penduduk.^{1,5-7}

Di Indonesia KNF menempati urutan kelima dari seluruh keganasan kepala dan leher dan berada di urutan pertama dalam Bidang Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala dan Leher (THT-KL). Insidensi KNF di Indonesia mencapai 6,7 per 100.000 penduduk per tahun dengan insidensi tertinggi pada dekade 4-5, perbandingan antara laki-laki dan perempuan adalah 2-3:1. Di Rumah Sakit Adam Malik Medan, Sumatera Utara, penderita KNF paling banyak pada suku Batak yaitu 46,7% dari 30 kasus. Insidensi KNF di Departemen Ilmu Kesehatan THT-KL RS. Dr. Cipto Mangunkusumo pada selama periode 1995-2000 adalah 49,7 % dan di Departemen Ilmu Kesehatan THT-KL RS Dr. Hasan Sadikin Bandung selama periode tahun 2005-2010 adalah 42,1%.^{7-10,12,}

Infeksi Virus Epstein-Barr (VEB) berperan penting dalam terjadinya KNF. Hampir 90% populasi di dunia terinfeksi oleh VEB infeksi primer biasanya terjadi pada awal kehidupan dan seringkali tidak memberikan gejala serta dapat persisten di dalam tubuh penderita. *Virus Epstein Barr* diduga merupakan salah satu faktor penting dalam mekanisme karsinogenesis KNF. Penelitian mengenai hubungan KNF dengan infeksi VEB terus berkembang dan terbukti VEB ditemukan pada KNF tipe III sebanyak 100%.^{1,11-13}

Virus Epstein Barr yang menginfeksi limfosit B mempunyai dua fase hidup yaitu fase laten dan litik. Pada fase laten VEB mengekspresikan protein virus, yaitu *Epstein-barr Nuclear Antigen-1* (EBNA-1) dan *laten membrane protein -1* (LMP-1), LMP-2, LMP2A. Sedangkan pada fase litik infeksi VEB terbagi

menjadi tiga fase , yaitu *immediate-early*, *early*, dan *late*. Shan dkk, di Cina melakukan pemeriksaan serologi Antibodi IgA Epstein Barr viral *capsid antigen* (VCA). Didapatkan sensitivitas dan spesifisitas serum VCA-IgA sangat tinggi dalam darah dan dapat dijadikan prediktor KNF. Krishna dkk di Afrika pada 2004 melakukan penelitian serum VEB *Deoxy Nucleotid Acid* (DNA) sebagai biomarker pada karsinoma nasofaring suku India asli, dengan hasil bahwa VEB DNA terdeteksi 69% dari bahan biopsi dan 58% dari serum VEB, dan dipakai sebagai tanda awal dalam mendeteksi KNF.^{14 - 21}

Latent membrane protein-1 merupakan onkogen potensial yang berperan penting, menyebabkan transformasi sel melalui empat jalur sinyal yang diindikasikan sebagai fungsi dari LMP-1 yaitu *nuclear factor-kB* (NF-kB), JNK(c-Jun N Terminal Kinase)/AP-1 (*Activator Protein-1*), P38/MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*), dan Jak (Janus Kinase)/STAT (*Signal Transducer and Activator of transcription*) menyebabkan transformasi sel melalui peningkatan regulasi gen antiapoptosis seluler yang berperan dalam aktifasi proliferasi dan ketahanan sel, sehingga sel menjadi imortal, mencegah apoptosis, menginduksi ekspresi EGFR pada sel epitel, produksi PGE2 serta memproduksi VEGF sehingga terjadi angiogenesis, limfangiogenesis, dan metastasis yang mempengaruhi progresifitas stadium klinis KNF sehingga prognosis menjadi buruk.²²⁻²⁵

Latent membrane protein-1 terlibat dalam pengaturan proliferasi sel dan apoptosis, yaitu memicu progresifitas dan proliferasi sel melalui siklus sel (fase G1/S) dan inhibisi apoptosis yang dimediasi p53, melalui jalur sinyal NF-kB.²²⁻²⁷

Gen supressor tumor p53 bermutasi pada 50% tumor diberbagai organ tubuh, sebanyak 60% pada tumor kepala leher dan dapat dijadikan sebagai suatu penanda tumor. Kerusakan DNA atau mutasi gen supressor tumor p53 disebabkan oleh faktor genetik, lingkungan, dan infeksi VEB sehingga terbentuk protein p53 mutan yang tidak stabil dan tidak menghambat fase G1 ke S menyebabkan kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, mutasi akan terfiksasi pada sel yang membelah kemudian berdiferensiasi dan menyebabkan proses keganasan pada sel epitel nasofaring. Ekspresi p53 yang tinggi didapatkan pada penderita KNF, dibandingkan tumor kepala leher lainnya karena menghilangnya fungsi protektif. Delfitri dkk, di medan tahun 2006 dalam penelitiannya terhadap 34 sampel blok parafin biopsi nasofaring menunjukkan keganasan yang dilakukan pemeriksaan imunohistokimia p53, disimpulkan bahwa ekspresi protein p53 mutan dijumpai 76,5% dari 34 sampel pada karsinoma tidak berdiferensiasi sebanyak 50%.^{28, 29}

Latent Membrane Protein-1 merupakan gen laten VEB yang ditemukan mengalami transformasi galur sel dan merubah fenotip untuk mencegah sel yang terinfeksi VEB mengalami apoptosis yang dimediasi oleh p53 dengan menginduksi protein anti-apoptosis seperti BCL-2, A20, dan MCL-1 serta mengaktifkan NF- κ B melalui pengikatan *tumor necrosis factor-associated factors* (TRAFs). Peningkatan ekspresi NF- κ B yang berlebihan pada KNF menyebabkan aktifnya proliferasi dan jalur survival yang melibatkan p53 sehingga menyebabkan pembesaran massa tumor yang berhubungan dengan stadium klinis KNF.²³⁻²⁵

Tsang dkk, pada tahun 2001 meneliti LMP1 dengan melakukan apusan nasofaring kemudian diperiksa dengan menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Wong dkk, pada tahun 2000 di Singapore melakukan penelitian serologi VEB *Early Antigen* (EA) dengan spesifisitas 80% yang digunakan untuk mengidentifikasi penderita KNF dengan teknik *immunofluorescence assay* di RS Singapore. Khabir dkk, melakukan penelitian tentang peningkatan ekspresi LMP-1 dihubungkan dengan usia penderita karsinoma nasofaring di Afrika Utara, melalui pemeriksaan imunohistokimia dengan kesimpulan bahwa peningkatan LMP-1 sangat kuat berhubungan dengan usia, dengan didapatkan tingginya jumlah protein virus yang dideteksi pada usia muda. Tawevisit dkk di Bangkok, tahun 2007 melakukan penelitian korelasi antara p53 dengan proliferasi sel KNF tidak berdiferensiasi dengan mempergunakan teknik imunohistokimia, didapatkan ekspresi berlebihan p53 pada stadium IV yang secara statistik signifikan dengan tingginya proliferasi sel tumor. Yenita dkk di Bali tahun 2012, melakukan penelitian mengenai korelasi antara LMP-1 VEB dengan p53 pada karsinoma nasofaring dengan teknik imunohistokimia, disimpulkan bahwa KNF mengekspresikan LMP-1 sebanyak 91,8% dan p53 sebanyak 97,9%. Terdapat korelasi positif lemah antara ekspresi LMP-1 dengan p53.²⁹⁻³⁴

Imunohistokimia merupakan metode untuk mendeteksi antigen spesifik dalam sel tumor, dapat menentukan lokasi pada sitoplasma atau nukleus, karakteristik, dan diagnosis. Ekspresi LMP-1 dan p53 pada sel karsinoma nasofaring dapat dideteksi dengan menggunakan pemeriksaan imunohistokimia dengan menilai distribusi dan intensitas dari pulasan yang memberikan warna kecoklatan pada

sitoplasma atau inti sel. Pemeriksaan imunohistokimia lebih mudah didapati diberbagai rumah sakit dan biaya yang dikeluarkan lebih murah dibandingkan *immunofluoescence assay* dan PCR.³⁵⁻³⁷

Atas dasar latar belakang tersebut dilakukan penelitian dengan melakukan pemeriksaan imunohistokimia untuk mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis penderita KNF.

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring ?
2. Apakah terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi P53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring ?
3. Apakah terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring ?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dengan stadium klinis penderita karsinoma nasofaring
2. Mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi P53 dengan stadium klinis penderita karsinoma nasofaring

3. Mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.

1.4. Kegunaan Penelitian

1.4.1. Kegunaan Ilmiah

Dapat digunakan sebagai tambahan pengembangan ilmu pengetahuan mengenai patogenesis molekuler LMP-1 dan p53 pada karsinoma nasofaring.

1.4.2. Kegunaan Praktis

1. Dapat dijadikan sebagai prosedur pemeriksaan pada penderita karsinoma nasofaring untuk mengetahui progresifitas penyakit.
2. Dapat digunakan sebagai sumber data untuk penelitian selanjutnya.

BAB II

KAJIAN PUSTAKA, KERANGKA PEMIKIRAN, DAN HIPOTESIS

2.1 Kajian Pustaka

2.1.1 Karsinoma Nasofaring

Karsinoma nasofaring merupakan tumor ganas kepala dan leher yang berasal dari epitel nasofaring, lebih sering terdapat pada dinding lateral yaitu daerah fossa rosenmuler, torus tubarius, dan orifisium tuba.¹⁻⁴

2.1.2 Faktor Risiko Karsinoma Nasofaring

Karsinoma nasofaring merupakan tumor yang unik karena etiologi dan distribusi endemiknya. Faktor etnik dan daerah juga mempengaruhi risiko penyakitnya. Penyebab KNF tidak hanya berhubungan dengan tembakau dan

penggunaan alkohol, tetapi multifaktor seperti lingkungan, genetik dan infeksi virus.^{1, 7, 8, 9, 12}

2.1.2.1 Faktor Lingkungan

Penelitian epidemiologi menunjukkan hubungan yang kuat antara peningkatan konsumsi bahan makanan berupa ikan atau udang yang diawetkan dengan garam (diasinkan), seperti ikan asin, pindang asin, udang asin, atau yang dikeringkan dengan pengasapan.^{1, 5, 7-9}

Penduduk di daerah Canton, China selatan, China Utara, dan Thailand memiliki kebiasaan mengkonsumsi ikan asin sejak kecil dikenal sebagai *Cantonese salted fish* dan makanan yang mengandung nitrosodimethyamine (NDMA), N-nitrosopyrrolidene (NPYR), serta nitrospiperidine (NPIP) yang merupakan zat karsinogen. Pada proses pengasinan atau pengeringan ikan asin dengan pemanasan sinar matahari terjadi reaksi biokimiawi berupa nitrosasi, dimana gugus nitrat dan nitrit yang terbentuk akan bereaksi dengan ekstrak ikan asin menjadi nitrosamin yang merupakan pro karsinogen dan promotor aktivasi EBV. Prokarsinogen yang memerlukan perubahan metabolisme agar menjadi karsinogen aktif, sehingga menimbulkan perubahan DNA, RNA, atau protein sel tubuh.^{1, 7-9}

2.1.2.2 Faktor Genetik

Kerentanan genetik sebagai faktor predisposisi KNF didasarkan fakta banyaknya penderita dari bangsa atau ras China di China selatan, Asia Tenggara,

Kutub Utara, dan Timur Tengah. Distribusi ras/etnis dan geografis, khas pada KNF di seluruh dunia menunjukkan bahwa faktor lingkungan dan sifat-sifat genetik berkontribusi untuk berkembangnya keganasan ini. Hal ini dapat dilihat dari penelitian bahwa KNF cenderung teragregasi dalam suatu keluarga di Canton, Provinsi Guangdong, Cina, dengan tidak adanya keganasan lain. Adanya riwayat tumor ganas dalam keluarga merupakan faktor risiko KNF.^{1, 7, 10-13}

Beberapa penelitian tentang *human leucocyte antigen* (HLA) menunjukkan adanya peningkatan frekuensi HLA pada penderita KNF. Menurut Munir dkk pada penelitiannya di Medan, menyatakan bahwa HLA merupakan petanda imunogenik seseorang yang berperan pada respon imun terutama infeksi intraseluler seperti infeksi VEB yang diturunkan secara heterozigot dan bersifat kodominan serta mengikuti pola induk kelompok rasnya.^{1, 10-13,}

2.1.2.3 Infeksi Virus Epstein Barr

Virus Epstein Barr, pertama kali ditemukan oleh Anthony Epstein dan Yvonne Barr pada tahun 1964. Virus epstein barr merupakan virus yang menginfeksi *human B lymphocyte*, berhubungan dengan infeksi mononukleosis, limfoma burkitt's, dan KNF.^{1, 13-16}

Infeksi primer VEB dapat terjadi mulai masa kanak-kanak, menimbulkan gejala ringan seperti demam dan faringitis dan dapat sembuh sendirinya.^{8, 11,14, 15}

Hubungan antara KNF dan VEB telah diteliti pada beberapa studi seroepidemi, didapatkannya DNA VEB persisten dan/atau virus *determined nuclear antigen* pada sel KNF. Terdapat peningkatan serum antibodi IgA yaitu

viral capsid antigen (VCA) dan *early antigen (EA)* serta genom virus pada sel tumor.¹¹⁻¹⁸

2.1.3 Anatomi Nasofaring

Secara anatomis nasofaring terletak pada bagian posterior koana dan berlanjut ke aspek posterior rongga hidung, inferior dipisahkan dari orofaring. Nasofaring termasuk bagian faring yang bentuknya romboid atau mirip suatu kubus tidak teratur dengan diameter posteroposterior 2-4 cm, lebar 4 cm, dan tinggi 4 cm. Bagian superior dibatasi oleh basis kranii, inferior dengan bidang datar yang melalui palatum mole, anterior berhubungan dengan kavum nasi melalui koana, posterior dengan vertebra servikalis, dan lateral dengan otot-otot konstriktor faring.^{1, 2, 4}

2.1.4 Histopatologi

Epitel permukaan mukosa nasofaring sebagian besar adalah epitel skuamosa dengan fokus epitel respiratorius (*pseudostratified*), jaringan limfoid pada stroma submukosa, kelenjar seromusinus, dan komponen penyusun jaringan ikat. Beberapa variasi tumor ganas secara teoritis berasal dari mukosa ini. Gambaran histologi menunjukkan daerah epitel transisional antara perbatasan epitel pseudostratified bersilia dengan epitel skuamosa merupakan *insitu change*. Beberapa peneliti menyatakan bahwa karsinoma nasofaring merupakan hasil akhir yang mengikuti proliferasi sel-sel didahului oleh hiperplasia sel, metaplasia atipikal, dan atau hiperplasia atipikal dari epitel permukaan.^{1, 39}

Klasifikasi gambaran histopatologi karsinoma nasofaring yang dikemukakan oleh Shanmugaratnam, direkomendasikan oleh WHO tahun 1978 dibedakan dalam tiga tipe, yaitu Karsinoma sel skuamosa berkeratin (WHO tipe I), Karsinoma sel skuamosa tidak berkeratin (WHO tipe II), dan Karsinoma tidak berdiferensiasi (WHO tipe III).^{1, 39}

2.1.5 Stadium Klinis

Suatu sistem klasifikasi yang di kembangkan oleh *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) untuk menjelaskan ekstensi maupun progresifitas penyakit pada pasien karsinoma nasofaring dengan menggunakan sistem penilaian TNM (ukuran tumor, KGB yang terlibat, maupun metastasis).^{1, 3}

Klasifikasi T adalah periode atau fase terpisah didalam perjalanan penyakit merupakan klasifikasi neoplasma menurut perkembangan tumor yang dinilai berdasarkan tumor primer. Sedangkan stadium penyakit karsinoma nasofaring dinilai menurut tiga komponen dasar; tumor primer (T), kelenjar regional (N), metastase (M).^{1-4, 11}

Penentuan stadium terbaru karsinoma nasofaring berdasarkan atas kesepakatan antara UICC (*Union Internationale center Cancer*) dan AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) pada tahun 2013 membagi stadium karsinoma nasofaring menjadi stadium I, II, III, IVA, IVB, dan IVC. Stadium I dan II sebagai stadium awal, sedangkan stadium III dan IV sebagai stadium lanjut, yang dapat digunakan sebagai dasar penilaian progresifitas penyakit.³

2.1.6. Gambaran Klinis

Gejala dini karsinoma nasofaring sulit dikenali karena mirip dengan infeksi saluran nafas atas. Gejala klinik stadium awal meliputi gejala hidung dan telinga karena tumor terbatas pada mukosa nasofaring. Tumor tumbuh di *fossa Rosenmuller* dinding lateral nasofaring dan meluas ke dinding belakang dan atap nasofaring, menyebabkan permukaan mukosa meninggi dan biasanya rapuh sehingga pada iritasi ringan terjadi perdarahan. Timbul keluhan pilek berulang dengan ingus bercampur darah serta epistaksis. Tumor dapat menyumbat muara tuba eustakius, sehingga pasien mengeluhkan rasa penuh di telinga, berdenging, dan gangguan pendengaran yang umumnya unilateral.^{1, 2, 8, 11}

Pada stadium lanjut gejala klinis lebih jelas dirasakan oleh pasien, karena tumor primer telah meluas ke organ sekitar nasofaring atau bermetastasis regional ke kelenjar getah bening servikal. Gejala yang dapat timbul adalah gangguan syaraf otak karena pertumbuhan ke rongga tengkorak dan pembesaran kelenjar leher. Tumor yang meluas ke rongga tengkorak melalui foramen laserum dan foramen ovale sepanjang fossa kranii media mengenai grup anterior saraf otak yaitu syaraf otak III, IV dan VI, sedangkan saraf ke II paling akhir mengalami gangguan. Dapat juga mengenai saraf ke V. Parese saraf ke II menyebabkan gangguan visus, parese saraf ke III menyebabkan kelumpuhan otot levator palpebra dan otot tarsalis superior sehingga menimbulkan ptosis, parese III, IV, dan VI menyebabkan keluhan diplopia karena saraf tersebut berperan dalam pergerakan bola mata, parese saraf ke V memberi keluhan berupa hipestesi (rasa tebal) pada pipi dan wajah. Tumor yang meluas ke belakang rongga tengkorak

akan mengenai grup posterior yaitu syaraf otak IX-XII yang disebut sindroma retroparotidean. Bila mengenai syaraf ke IX akan menyebabkan kesulitan menelan karena hemiparese otot konstriktor faringus superior, syaraf ke X menyebabkan gangguan motorik berupa afoni, disfoni, disfagia, dan spasme esofagus serta gangguan sensorik berupa nyeri daerah laring, faring, dispne dan hipersalivasi. Kerusakan syaraf ke XI menyebabkan kelumpuhan otot trapezius, sternokleidomastoideus serta hemiparese palatum molle, dan syaraf XII menyebabkan hemiparese dan atrofi sebelah lidah.^{1, 2, 8, 11}

Metastasis tumor melalui kelenjar getah bening mengakibatkan timbulnya pembesaran kelenjar getah bening leher. Sel kanker dapat mengadakan infiltrasi menembus kelenjar dan mengenai otot dibawahnya. Metastasis jauh dapat mengenai tulang, paru-paru, mediastinum, dan hati (jarang). Sekitar separuh pasien memiliki gejala yang beragam, tetapi 10% asimtomatik.^{1, 2, 8, 11}

2.1.7 Diagnosis

Karsinoma nasofaring sulit untuk didiagnosis, karena letaknya tersembunyi dan pada keadaan dini pasien tidak datang untuk berobat. Pasien datang berobat bila gejala yang dirasakan telah mengganggu dan tumor telah infiltrasi serta metastasis.^{1, 2, 8}

Pasien yang dicurigai penderita KNF dengan adanya gejala harus dilakukan anamnesis tentang keluhan benjolan di leher yang biasanya menyebabkan penderita datang untuk berobat, kemudian keluhan gangguan hidung, gangguan telinga, sakit kepala, penglihatan ganda hingga kelainan syaraf kranial. Tanda

klinis yang ditemukan saat diagnosis ditegakkan adalah pembesaran kelenjar getah bening leher dan kelainan saraf kranial. Bila secara klinis dicurigai menderita KNF dan tumor tidak terlihat secara endoskopi, maka dapat dilakukan pencitraan dengan potongan lintang (CT Scan / MRI).^{1, 2, 8, 11}

Pemeriksaan histopatologi biopsi dari nasofaring sampai saat ini merupakan standar baku untuk menegakkan diagnosis.^{1, 11}

Pemeriksaan lain yang dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis KNF meliputi pemeriksaan nasofaringoskopi, radiologi, serologi, dan pemeriksaan patologi (biopsi).^{1, 11, 13}

2.1.7.1 Pemeriksaan Nasofaring

Pemeriksaan tumor primer di nasofaring dapat dilakukan dengan cara rinoskopi posterior (tidak langsung) dengan menggunakan kaca laring yang kecil dan cara nasofaringoskopi (langsung) dengan alat endoskopi/nasofaringoskop kaku atau dengan rinolaringoskopi serat lentur.^{1, 2, 13}

2.1.7.2 Pemeriksaan Radiologi

Pemeriksaan radiologi diperlukan untuk mendapatkan informasi adanya tumor, perluasan serta kondisi setelah terapi. Pemeriksaan radiologi untuk karsinoma nasofaring yaitu foto polos tengkorak, CT Scan, dan MRI.¹

2.1.7.3. Pemeriksaan Patologi

Diagnosis pasti karsinoma nasofaring ditegakkan berdasarkan pemeriksaan jaringan tumor nasofaring.^{1, 11} Pemeriksaan patologi anatomi untuk karsinoma nasofaring terdiri dari :

a. Biopsi Aspirasi Jarum Halus

Biopsi aspirasi jarum halus pada kelenjar getah bening servikalis. Sejumlah kasus karsinoma nasofaring diketahui berdasarkan pemeriksaan sitologi biopsi aspirasi kelenjar getah bening servikal. Pemeriksaan sitologi dapat membedakan karsinoma sel skuamosa dan karsinoma tidak berdiferensiasi.^{1, 39}

b. Biopsi

Konfirmasi diagnostik KNF diperoleh dengan hasil biopsi positif yang diambil dari tumor di nasofaring. Prosedur standar saat ini adalah biopsi transnasal dengan panduan endoskopi rigid 0⁰ dan 30⁰ memberikan visualisasi yang baik.¹

c. Serologi

Pada tumor, DNA *Epstein Barr* bersifat homogen dan klonal melalui pengulangan skuensi. Ekspresi *specific viral messenger RNAs* atau produk gen secara konsisten dapat dideteksi pada seluruh sel tumor dengan pemeriksaan hibridisasi insitu, teknik imunohistokimia, dan PCR. Antibodi VEB baik IgG dan IgA penderita KNF meningkat 8-10 kali lebih tinggi dibandingkan penderita tumor lain atau orang sehat. Titer IgA terhadap VEB spesifik untuk kapsul virus VCA dan EA. Deteksi antibodi IgG (yang dijumpai pada masa awal infeksi virus) dan antibodi IgA (yang dijumpai VCA) digunakan untuk mendukung diagnosis karsinoma nasofaring.^{11, 12, 21}

Teknik imunohistokimia merupakan teknik deteksi yang sangat baik, menunjukkan secara tepat protein tertentu di dalam jaringan, digunakan dalam pemeriksaan ekspresi protein untuk identifikasi, lokalisasi, dan karakteristik suatu antigen tertentu, serta menentukan diagnosis, terapi, dan prognosis kanker. Lokalisasi yang didapatkan dalam potongan parafin untuk fase laten dan litik virus yaitu EBNA1, EBNA2, LMP 1, BHRF1, BZLF1 dan BMRF1. Teknik ini diawali dengan pembuatan irisan jaringan (histologi) untuk diamati dibawah mikroskop. Tempat pengikatan antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan petanda yang biasanya dilekatkan pada antibodi dan bisa dilihat secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi berupa senyawa berwarna. Enzim (yang dipakai untuk menandai) selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen (yaitu substrat yang menghasilkan produk akhir berwarna dan tidak larut), diamati dengan mikroskop *bright field* (mikroskop bidang terang) seiring berkembangnya ilmu pengetahuan, khususnya dunia biologi, teknik imunohistokimia dapat langsung diamati (tanpa direaksikan lagi dengan kromogen yang menghasilkan warna) dibawah mikroskop *fluorescence*.^{37, 41}

Interpretasi hasilnya termasuk menentukan spektrum gen yang di ekspresikan dan lokasi jina atau sel yang muncul untuk diagnosis dari VEB berhubungan dengan penyakit. Pemeriksaan imunohistokimia LMP1 dapat menggunakan *mouse monoclonal anti Epstein Barr virus LMP-1 antibody* Dako sedangkan pemeriksaan imunohistokimia p53 menggunakan *mouse monoclonal p53 antibody* Dako, yang akan memberikan hasil positif bila terlihat warna kecoklatan pada sitoplasma dan membran sel.^{35, 42}

2.2 Virus Epstein Barr

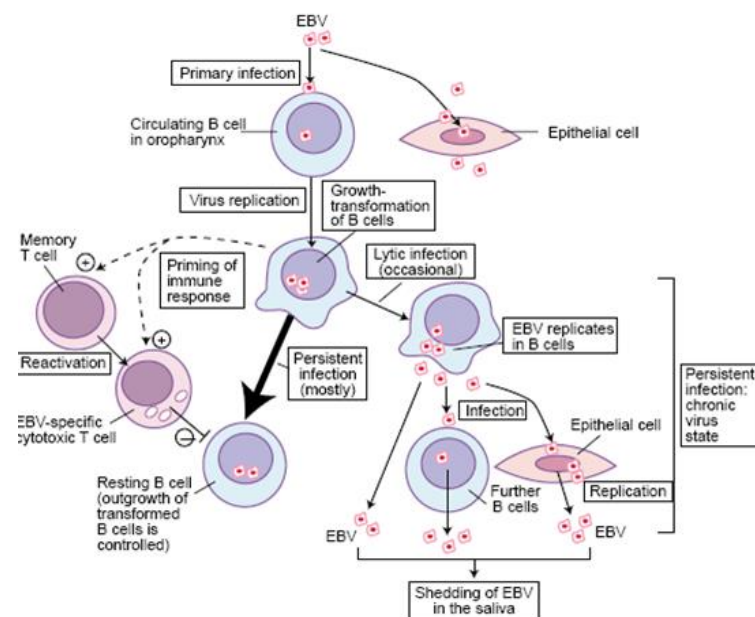
Virus *Epstein Barr* merupakan kelompok *Herpes* dengan sub famili *Gammaherpesviridae* atau yang sering disebut famili *Herpes* virus. Genom VEB berisi molekul DNA linier yang mengkode kurang lebih 100 protein virus *Epstein Barr*. Virus epstein barr mempunyai komponen inti, kapsul, dan selaput pembungkus. Didalam inti terdapat DNA, yang dikelilingi oleh kapsul yang disebut kapsomer. Inti dan kapsul dikelilingi selaput pembungkus glikoprotein yang disebut *envelope*.^{11, 15-17}

Virus *Epstein Barr* merupakan virus DNA onkogen dan berhubungan dengan beberapa penyakit antara lain karsinoma nasofaring, infeksi mononukleosis, limfoma Burkit, dan penyakit Hodgkin.¹⁵

Infeksi sel epitel oleh VEB mengakibatkan replikasi yang aktif dan produksi virus yang bertambah serta lisis dari sel, bila virus *Epstein Barr* menyerang sel limfosit B akan mengakibatkan infeksi laten dengan *immortalisasi* sel. Setelah VEB menginfeksi limfosit B, yang semula linear akan berubah menjadi sirkuler, sehingga menetap menjadi laten di limfosit B. Masuknya VEB ke dalam limfosit B karena adanya ikatan selektif pada komponen *cluster of differentiation* (CD)21. CD21 ini dikenali oleh Glikoprotein (GP) 350/220 yang merupakan reseptor membran virus.^{14, 23-25}

Infeksi VEB bermula dari kontak dengan sekret mulut yang terinfeksi kemudian virus bereplikasi di sel epitel orofaring maupun di nasofaring. Virus menetap dalam sel epitel sehingga menginfeksi *sel limfosit B resting*, kemudian

bersirkulasi berubah menjadi sel limfosit B yang terinfeksi. Pada infeksi pertama oleh VEB, sel limfosit B mengalami infeksi litik dengan menghasilkan virus hasil replikasi yang menyerang sel limfosit B lainnya, mengekspresikan komponen virus laten sebagian virus yang lain akan menyerang sel epitel yang lain dan menyebar ke air liur, sebagian sel limfosit B yang terinfeksi kemudian tertangkap oleh sel *natural killer* dan sel T sitotoksik. Virus *Epstein Barr* berada dalam darah perifer didalam sel B memori laten terinfeksi mengekspresikan LMP 2 dan EBNA1. Selanjutnya didalam sel dapat mengalami reaktivasi dan mengekspresikan protein fase laten sehingga dapat dirusak oleh sel T sitotoksik. Beberapa sel laten yang terinfeksi dapat mengalami replikasi litik kembali. Replikasi virus menyebabkan peningkatan jumlah VEB yang menginfeksi sel B dalam darah perifer. Sehingga hal ini dapat menyebabkan peningkatan titer Ig A antibodi terhadap struktur protein VEB.^{14-17, 22-25}



Gambar 2.1 Infeksi virus Epstein Barr pada pembawa virus yang sehat.

Dikutip dari : Murray.⁴³

Proses karsinogenesis yang disebabkan oleh VEB terjadi pada infeksi laten. Infeksi laten VEB berdasarkan ekspresi protein dibagi menjadi 3 tipe laten. Latensi tipe I akan mengekspresikan *epstein barr virus encoded RNAs* (EBER), EBNA1 dan LMP2B, pola ini ditemukan pada limfosit dalam sirkulasi karier yang sehat, dan pada penderita Burkitt limfoma serta karsinoma gaster. Latensi tipe II ditandai dengan adanya ekspresi LMP-1 dan LMP-2B, yang ditemukan pada KLF, Hodgkin Limfoma, dan Limfoma sel T. Latensi tipe III akan mengekspresikan viral gen laten secara lengkap yaitu EBNA (1, 2, 3A, 3B, 3C, LP), LMP (1, 2A, 2B) dan EBER dan ditemukan pada kasus infeksi mononukleosis.^{15, 22-25}

2.2.1 Fase Lisis

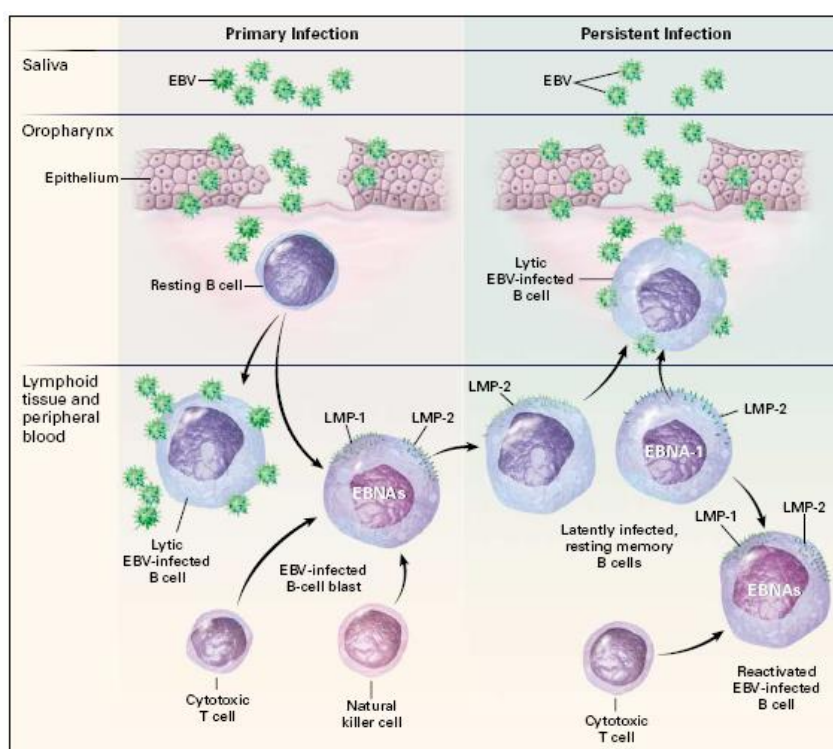
Didalam sel limfosit B, VEB berikatan dengan reseptor CD21 maka VEB masuk ke dalam sel inang dan mengalami penetrasi secara komplis. Virus keluar dari sel yang mati dan menginfeksi sel lain. Di dalam sel tersebut virus mengalami replikasi dan akan dihasilkan genom virus dengan *double strand* yang linier, sebelumnya genom virus berbentuk sirkuler. Fase lisis ini ditandai oleh ekspresi transkripsi protein virus yaitu salah satunya adalah VCA. Infeksi litik terbagi menjadi tiga fase ekspresi gen, yaitu *immediate-early*, *early*, dan *late*. Fase *immediate-early* mengekspresikan Rta (*BRLF1 transcriptional activator*) dan Zta (*BZLF1 transcriptional activator*) merupakan aktivator utama dalam siklus lisis.

Pada fase awal diekspresikan BMRF1, BALF2, BALF5, BORF2, BARF1, BXLF1, BGLF5, BSLF1, BBLF4, dan BKFR3 dan fase *late* mengekspresikan BLLF1, BXLF2, BKRF2, BZLF2, BALF4, BDLF3, BILF2, dan BCRF1. Fase awal, mengekspresikan komponen replikasi DNA virus. Ekspresi gen lisis fase awal VEB jarang terjadi pada keganasan yang berasosiasi dengan VEB dan tidak berkontribusi terhadap proses onkogenesis. Protein yang diekspresikan pada fase lisis adalah BHRF1.^{15, 19, 22-25}

2.2.2. Fase Laten

Infeksi laten berasal dari kontak saliva, VEB akan menginfeksi sel limfosit B dan menghasilkan sejumlah protein laten yaitu EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3 dan tiga membran protein yaitu LMP-1, LMP-2A, dan LMP-2B.^{24,25} Infeksi VEB pada sel B dimulai dengan penyerangan virus membran dengan GP 350/220 yang mengandung glikoprotein terhadap komplemen reseptor (molekul CD21) limfosit. Sebagai koreseptor masuknya VEB ke dalam sel B adalah *Major Histocompatibility Complex* (MHC) molekul kelas B. Setelah penyerangan ini kompleks CD21 menjadi *cross link*, menyebabkan aktivasi sinyal yang diduga untuk mempersiapkan sel terinfeksi VEB. Virus Epstein-Barr yang berikatan dengan CD21 segera mengaktifkan tirosin kinase *lck* dan memobilisasi kalsium. Hal ini akan diikuti oleh meningkatnya sintesis dari mRNA, pembentukan sel blast, adhesi sel homotipik, dan ekspresi CD23 ke permukaan sel limfosit kemudian akan dihasilkan *interleukin* (IL)-6. Genom virus kemudian menjadi tidak mempunyai penutup (*uncoating*) dan akan menuju nukleus yang merupakan tempat virus bersirkulasi. Sirkulasi dan ekspresi dari Wnt promoter memulai

kaskade untuk mengekspresikan protein EBNA dan dua LMP. Gen virus yang diekspresikan ini mempertahankan genom virus tetap hidup di dalam sel limfosit B. Di dalam sel limfosit B VEB akan hidup secara laten untuk kelangsungan hidupnya (latensi II) dan hidup secara persisten (latensi I).^{15, 19, 22-25}



Gambar 2.2 Infeksi primer dan persisten virus Epstein Barr.

Dikutip dari : Jeffrey.⁴⁴

2.2.3. Latent Membrane Protein-1 (LMP-1)

Latent Membrane Protein-1 merupakan salah satu dari lima protein yang dikodekan VEB untuk immortalisasi sel B, dan diekspresikan pada fase laten. Infeksi VEB diduga sebagai penyebab dari KMF dan LMP-1 memegang peran penting dalam aktifitas transformasi VEB pada KMF.^{15, 22-22}

Latent Membrane Protein-1 menunjukkan kesamaan fungsional dengan anggota keluarga *Tumor Necrosis Receptor Factor* (TNFR) : TNFR1 dan CD40. Kesamaan fungsional yang dikaitkan dengan perekrutan sejumlah protein sinyal TNFR terkait, antara lain meliputi faktor TNFR-associated (TRAFs) dan TNFR-associated domain protein (TRADD). Tidak seperti TNFR1 dan CD40, sinyal LMP-1 dalam konstitutif, membentuk ligan independen.²²⁻²⁵

Latent Membrane Protein-1 adalah protein membran dengan berat molekul 60-66 kDa yang berasal dari transkripsi BNFL1. *Latent membrane protein-1* merupakan protein membran integral yang terdiri dari asam amino pendek sitoplasma N-terminus (asam amino 1-23), enam daerah hidrofobik alpha-heliks transmembran (asam amino 24-186) dan 200 asam amino besar sitoplasma C-terminal (asam amino 187-386). Sementara sitosol amino-terminus dari LMP1 berperan dalam orientasi dan pengolahan LMP1, domain transmembran hidrofobik (TM) domain self- agregat dan berpartisipasi dalam oligomerisasi intermolekuler. Domain TM merekrut RhoGTPase Cdc42, yang menginduksi perbaikan cytoskeletal dan terlibatnya jalur sinyal yang berdampak pada proliferasi sel dan *autophagy*. Sitosol C-terminus besar dari LMP1 memiliki sebagian besar kapasitas sinyal protein, mengandung tiga domain fungsional yang diistilahkan *C-terminal activating region* 1-3 (CTAR1, CTAR2 dan CTAR3). CTAR-1 berlokasi di daerah proksimal dari membran dan penting sebagai mediator VEB untuk transformasi primer di dalam sel B. CTAR-2 berlokasi didaerah C terminal dari LMP1 dan dibutuhkan untuk sinyal adapter protein, yang meliputi *TNFR-associated factors* (TRAFs), *TNFR associated death domain*

(TRADD), *Receptor interacting protein kinase* (RIP), BS69 dan *Janus kinase* (JAK)-3 protein, yang mentransduksi sinyal melalui jalur NF - kB, JNK/p38-SAPK, PI3-K/Akt, ERK-MAPK dan jalur JAK/STAT.²²⁻²⁵

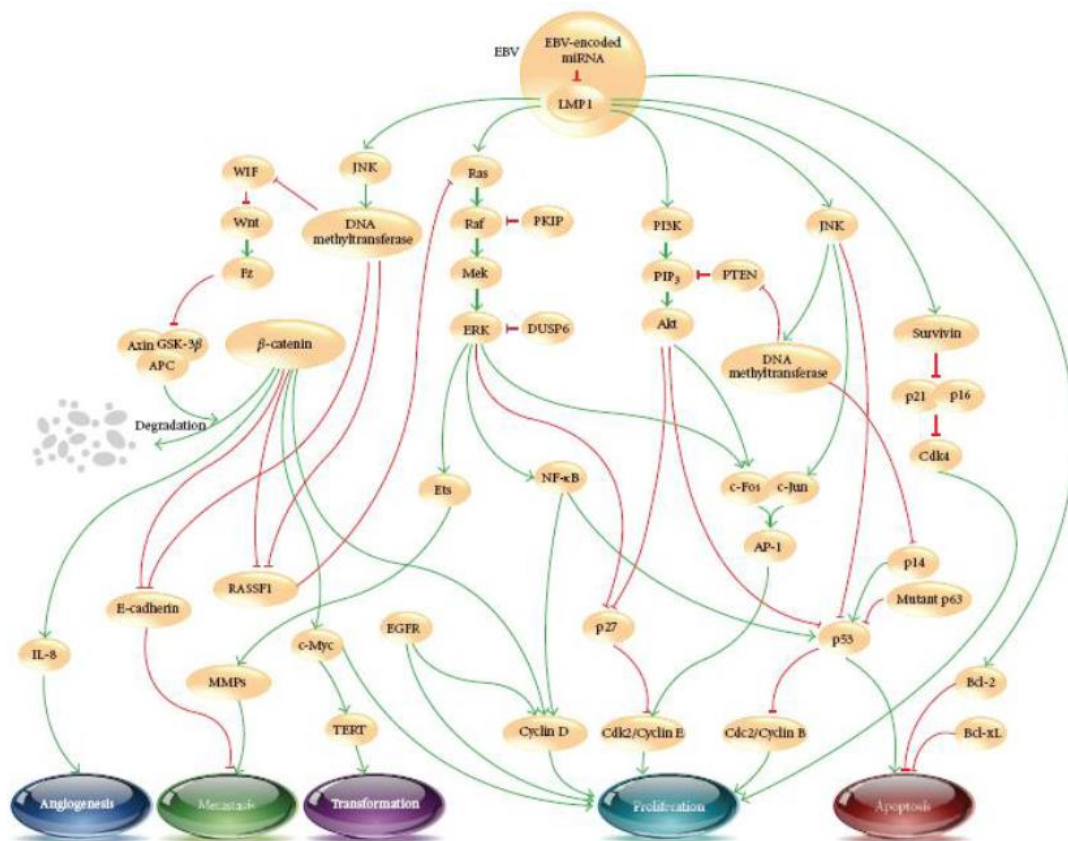
Aktivasi faktor transkripsi NF-kB merupakan indikasi pertama yang penting bagi penyimpangan sinyal sel dari LMP1, CTAR1, dan CTAR2 dapat mengaktifkan NF-kB secara independen. Sinyal CTAR1 dimediasi terutama melalui pengikatan protein TRAF. TRAF1/2/3/5 dan mungkin TRAF6, mengikat CTAR1 secara langsung, sehingga aktivasi non-kanonik jalur NF-kB2 melalui jalur TRAF-NIK-IKK. Dalam sel-sel epitel, CTAR1 juga melibatkan kanonik jalur NF-kB1 untuk menghasilkan kompleks baru NF-kB yang mempengaruhi ekspresi epitel gen-gen tertentu. Berbeda dengan CTAR1, CTAR2 dimediasi aktivasi NF-kB1 terjadi melalui perekrutan langsung dari TRAF/ 6 untuk TRADD atau BS69, dan jalur aktivasi NF-kB kanonik melalui jalur yang di mediasi TAB1-TAK1-IKK α / IKK β / IKK γ . Sementara CTAR1 dan CTAR2 berkontribusi dalam aktivasi p38-SAPK, aktivasi JNK/AP1 ke CTAR2. NF-kB aktif menginduksi immortalisasi sel melalui peningkatan regulasi aktivitas telomerase melalui translokasi ikatan protein hTERT ke NF-kB, menghambat apoptosis sel melalui peningkatan regulasi aktivitas survivin, dan merangsang proliferasi sel melalui regulasi survivin, cyclin D1, dan EGFR. *Latent membrane protein-1* dapat meningkatkan tingkat fosforilasi serine dan ennexin A2 oleh aktivasi jaras penandaan PKC yang dapat merangsang proliferasi sel. *Latent membrane protein-1* CTAR2 memicu AP-1 dengan mengaktifkan ERK, P38 dan c-Jun N-Terminal Kinase (JNKs), MAP kinase, melalui pengikatan dengan kompleks

TRADD/TRAF2. AP1 aktif meningkatkan regulasi ekspresi MMP9 dan memediasi invasi dan metastasis sel KNF. CTAR3 antara CTAR1 dan CTAR2 memicu jalur JAK3/STAT yang akan meningkatkan transkripsi dan ekspresi VEGF, sehingga meningkatkan invasi dan metastasis sel KNF.²²⁻²⁵

Sebagian besar tumor KNF mengandung gen p53 yang berhubungan dengan ekspresi p53 antagonis. Latent membrane protein-1 dapat memodulasi aktivitas p53 dengan menginduksi induksi TNFAIP3/A20 yang berfungsi untuk menghambat p53 yang menyebabkan apoptosis. *Latent Membrane Protein-1* juga merangsang ekspresi Mdm2, mempromosikan penurunan p53, dan menekan transkripsi p53. *Latent Membrane Protein-1* juga dapat bersinergi dengan *bcl-2* untuk menekan pertumbuhan yang disebabkan oleh *wild type* p53.²³⁻²⁵

Salah satu fungsi LMP-1 yang memberikan kontribusi untuk sifat onkogenik adalah kemampuannya untuk melindungi sel dari apoptosis. Meskipun LMP1 tidak menginduksi Bcl2 pada sel epitel, LMP-1 tidak merangsang TNFAIP3/A20, MCL-1, c-IAP2 (BIRC3), dan survivin (BIRC5), melalui mekanisme dependent NF- κ B/AP-1. Keterlibatan LMP1 dari jalur *phosphorylates* PI3-K/Akt dan inaktivasi *pro-apoptosis Bad* dan protein FOXO3a. *Latent Membrane Protein-1* juga melindungi sel-sel epitel terhadap *deprivation induced apoptosis* (anoikis) oleh peningkatan ekspresi $\alpha 5 \beta 1$ dan αV yang mengandung integrin. Induksi interleukin (IL-1/6/10) dan sitokin pro-inflamasi lainnya dapat melindungi LMP-1 mengekspresikan sel dari apoptosis melalui aktivasi berkelanjutan NF- κ B dan STAT3.²³⁻²⁵

Karsinoma nasofaring merupakan penyakit dengan metastasis yang tinggi. Terdapat korelasi positif antara LMP1 positif dan tingkat metastasis tumor, LMP-1 memodulasi interaksi sel - matriks melalui induksi matriks *metalloproteinase* (MMPs) dan menurunkan berbagai penekan metastasis. *Latent Membrane Protein-1* meningkatkan regulasi ekspresi Ezrin , sebuah protein - sitoskeleton yang terlibat dalam invasi dan metastasis tumor. Sementara LMP-1 menginduksi ekspresi dari sejumlah MMPs in vitro, LMP-1 positif berkorelasi dengan ekspresi MMP-1, 3, dan 9 yang tinggi dan tingkat yang rendah dari ekspresi inhibitor jaringan *metalloproteinases* (TIMP) dalam metastasis KNF. *Latent membrane protein-1* dalam menginduksi MMP-1 memerlukan NF-kB. dan ERK-MAPK, dimana ekspresi MMP-9 memerlukan pembicaraan yang lebih kompleks antara AP-1 dan faktor transkripsi Ets1. Tingkat c-Met dan Ets1 berkorelasi dengan tingkat tinggi ekspresi MMP dalam metastasis KNF dengan LMP-1 positif. Selain MMPs, LMP-1 menginduksi ekspresi musin 1 (MUC1), glikoprotein mucinous diekspresikan pada banyak sel epitel, yang memainkan peran penting dalam invasi tumor dan metastasis dengan menentang adhesi sel.²³⁻²⁷



Gambar 2.4 Jalur sinyal LMP1 pada karsinogenesis KNF
Dikutip dari : Tulalamba.²⁵

2.3. p53

Protein p53 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1979 sebagai protein yang berhubungan dengan transformasi dan sebuah protein seluler yang berakumulasi di dalam inti sel kanker dan berikatan cukup kuat pada *simian virus 40* (SV40) antigen T. Gen yang mengkode p53 awalnya memiliki aktifitas onkogenik yang lemah sebagai protein p53 yang ekspresinya meningkat pada sel tumor. p53 pada manusia merupakan sebuah inti phosphoprotein dari MW 53 kDa, dikodekan oleh sebuah 20-kb gen yang berisi 11 exon dan 10 intron, yang berlokasi pada lengan kecil kromosom 17.²⁸⁻²⁹

p53 secara luas dikenali sebagai supressor tumor dan mengalami perubahan pada keganasan yang mengenai manusia, aktifitasnya meliputi regulasi siklus sel, induksi apoptosis, perkembangan, diferensiasi, amplifikasi gen, DNA *recombinant*, segregasi kromosom, dan penuaan sel. p53 berperan penting pada semua tipe kanker pada manusia, mutasi atau kehilangan gen p53 dapat ditemui pada 50% semua kasus kanker.^{28, 29}

Sebagai supressor tumor, p53 penting untuk mencegah proliferasi sel dan mempertahankan integritas sel yang diakibatkan stress genotoksik. Yang termasuk kelompok protein lainnya adalah protein retinoblastoma (p-Rb). Pada tumor ganas kepala dan leher dijumpai mutasi p53 sebanyak 60% dan dapat ditemukan pada lesi sebelum keganasan (*pre-malignant*). Banyaknya ekspresi p53 mutan mempunyai hubungan yang erat dengan meningkatnya insiden tumor primer dan dapat dijadikan merker untuk stadium molekuler dari tumor ganas kepala dan leher.^{29, 30}

Pemahaman mengenai pengendalian siklus pembelahan sel merupakan hal yang sangat penting dalam memecahkan penyakit keganasan, karena pada penyakit keganasan terjadi kegagalan dalam pengendalian siklus pembelahan sel, dimana sel mengalami pembelahan yang sangat cepat dan terus menerus. Protein yang berperan pada pengendalian siklus pembelahan sel adalah *tumor supressor gene* (antara lain p53, p21, BAX) dan protoonkogen (BCL-2). Peran p53 pada pengatur siklus pembelahan sel adalah untuk menghambat pembelahan sel, akan memicu proses transkripsi p21 yang menghambat CDK (CDK4 dan CDK6 pada fase G1, CDK2 pada fase S, dan CDK1 pada fase M). Bila CDK tidak berfungsi,

siklin tidak membentuk kompleks dengan CDK dan mengakibatkan siklus sel berhenti. Rendahnya p53 mengakibatkan penurunan p21. Selanjutnya kadar p21 yang rendah mengakibatkan CDK tidak mengalami penghambatan, sehingga siklin akan membentuk kompleks dengan CDK. Ikatan kompleks antara CDK-siklin mengakibatkan siklus sel akan terus berlanjut. Bila terjadi mutasi gen p53 atau BCL2, maka p53 mutan yang dihasilkan bersifat inaktif, sehingga protein ini tidak mampu memicu pembentukan p21. Rendahnya kadar p21 mengakibatkan CDK tidak dihambat dan akhirnya siklus pembelahan sel berjalan terus.^{23, 28, 29}

Fungsi p53 dapat diinaktivasi oleh berbagai mekanisme, diantaranya beberapa virus DNA tertentu yaitu virus Epstein Barr. Virus Epstein barr dapat mengikat protein p53 normal dan menghilangkan fungsi protektifnya.²⁹

p53 membantu perbaikan DNA melalui penghentian fase G1 dari siklus sel dan memicu gen yang memperbaiki DNA. Sel yang mengalami kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, diarahkan oleh p53 untuk mengalami apoptosis. Sepabila terjadi kerusakan atau mutasi dari gen supressor tumor p53 yang disebabkan oleh faktor genetik, lingkungan, dan infeksi VEB maka terbentuklah protein p53 mutan yang tidak stabil dan tidak menghambat fase G1 ke S sehingga kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki dan mutasi akan terfiksasi pada sel yang membelah, sehingga sel akan terus berdiferensiasi dan menyebabkan timbulnya proses keganasan pada sel epitel nasofaring.^{29, 30,34, 35}

Latent Membrane Protein-1 yang merupakan gen laten VEB dapat mentransformasi galur sel dan merubah fenotip sel karena potensial onkogeniknya sehingga dapat mencegah sel yang terinfeksi VEB dari apoptosis dengan

menginduksi protein anti-apoptosis seperti BCL-2, A20 dan MCL-1. *Latent Membrane Protein-1* juga terlibat dalam jalur persinyalan yang mengatur proliferasi sel dan anti-apoptosis, yaitu memicu progresifitas dan proliferasi sel melalui siklus sel (fase G1/S) dan inhibisi apoptosis.^{22, 23, 25}

Berdasarkan penelitian Tsang NM di China tahun 2001 meneliti tentang adanya gen LMP-1 dengan *swab* nasofaring di mukosa nasofaring pada penderita karsinoma nasofaring yang rekuren, kemudian diperiksa dengan *polymerase chain* PCR. Ekspresi dari LMP-1 KNF dari hasil *swab* pada pasien setelah terapi untuk KNF merupakan metode yang sensitif dan spesifik untuk melihat adanya rekurensi, tidak invasi tetapi diperlukan alat yang khusus kemudian dilakukan pemeriksaan PCR yang sulit dikerjakan di laboratorium kecil.³⁰

Wong dkk di Singapore tahun 2000 melakukan penelitian serologi terhadap VEB *Early Antigen* (EA) dengan spesifisitas 80% yang digunakan untuk mengidentifikasi penderita KNF dengan teknik *immunofluoescence assay* di RS Singaporedan biaya yang dikeluarkan mahal.³¹

Taweevisit dkk di Bangkok tahun 2007 melakukan peneliti tentang p53 dalam korelasinya dengan undiferensiasi karsinoma nasofaring, yang dilakukan di RS King Chulalongkorn, Bangkok dari tahun 2001-2005, terhadap 60 blok parafin pasien karsinoma nasofaring dengan pemeriksaan imunohistokimia p53 dan Ki67. Didapatkan KNF stadium IV yang terbanyak (35%) dan didapati ekspresi p53 sebanyak 73%. Disimpulkan bahwa tingginya jumlah p53 dengan jumlah penderita undiferensiasi KNF terdapat hubungan yang signifikan dengan proliferasi sel tumor yang tinggi.³³

Yenita dkk di Padang tahun 2012 melakukan penelitian untuk mengetahui korelasi antara LMP1 VEB dengan ekspresi p53 pada KNF. Dilakukan penelitian terhadap 49 blok parafin dari penderita KNF yang dianalisis dan dipulas secara imunohistokimia dengan antibodi LMP1 VEB dan p53. Korelasi antara ekspresi LMP1 dengan ekspresi p53 diuji dengan menggunakan uji Korelasi Pearson, dengan hasil terdapat korelasi yang lemah antara LMP1 dengan ekspresi p53 ($p < 0,05$) dan berpola positif.³⁴

Tabyaoui dkk di Maroko tahun 2013 melakukan penelitian untuk menilai ekspresi LMP1 VEB dan protein p53 berhubungan dengan tipe histologi KNF terhadap pasien di Maroko. Dilakukan penelitian pada 23 blok parafin dari penderita KNF yang dianalisis menggunakan imunohistokimia dengan antibodi LMP1 VEB dan p53. Disimpulkan bahwa terdapat ekspresi p53 dalam jumlah yang banyak pada pasien KNF di Maroko.³⁵

Permana AD dkk, tahun 2008 di RSHS Bandung meneliti tentang perbandingan respon tumor primer Karsinoma Nasofaring WHO tipe III yang disertai ekspresi LMP-1 dengan yang tanpa ekspresi LMP-1 terhadap terapi radiasi, menggunakan pemeriksaan imunohistokimia, menerangkan bahwa respon terapi radiasi eksterna penderita KNF WHO tipe III tidak dipengaruhi oleh LMP-1 pada jaringan tumor, dan didapatkan ekspresi LMP-1 sebesar 66,7% dari 45 kasus.⁴⁵

2.4 Kerangka Pemikiran

Karsinoma nasofaring merupakan tumor ganas yang berasal dari epitel nasofaring dengan predileksi tersering pada fossa rosenmuler. Faktor yang

menyebabkan terjadinya KNF adalah multifaktorial, yaitu faktor genetik, lingkungan, dan infeksi virus. Virus yang banyak dihubungkan dengan KNF adalah virus *Epstein Barr*.¹⁻⁷

Klasifikasi KNF menurut WHO, tipe III memiliki hubungan paling kuat dengan VEB, dibuktikan dengan ditemukan DNA VEB pada 100% sel tumor KNF. Pada KNF tipe II VEB terdapat pada 86% sel tumor, sedangkan pada KNF tipe I VEB didapatkan kurang dari 5% sel tumor.^{1,2}

Stadium klinis pada penderita KNF ditentukan dengan menilai adanya tumor primer, metastasis ke kelenjar getah bening regional, dan metastasis jauh.^{1,3}

Gejala klinis yang tidak khas dan letak nasofaring yang tersembunyi menyebabkan penderita karsinoma nasofaring datang terlambat dan sudah dalam keadaan stadium lanjut (stadium III dan IV). Pemeriksaan dengan menggunakan endoskopi juga sering tidak dapat mendiagnosis asalnya karsinoma nasofaring submukosa. Sehingga diperlukan pemeriksaan selain PCR dan hibridisasi insitu yaitu imunohistokimia LMP-1 dan p53 untuk mengetahui hubungannya dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.¹⁻⁴

Infeksi VEB bermula dari kontak melalui sekret mulut penderita yang terinfeksi VEB, kemudian virus bereplikasi di sel epitel pada orofaring maupun nasofaring. Setelah virus menetap dalam sel epitel, akan menginfeksi dan bereplikasi di dalam limfosit B yang bersirkulasi dan berubah menjadi sel limfosit B yang terinfeksi. Virus Epstein Barr berada diarah perifer didalam sel B memori laten yang terinfeksi.^{1, 10, 15-17}

Infeksi VEB pada KNF merupakan infeksi laten tipe II, ditandai dengan ekspresi gen laten yaitu EBNA1, LMP 1,2A dan EBER1.^{15, 22}

Latent Membrae Protein-1 merupakan salah satu dari lima protein yang dikodekan VEB yang diperlukan untuk immortalisas dan merupakan protein membran yang tersusun atas kompleks molekul yang terdiri dari sitoplasmik amino terminus, enam transmembran domain, dan *cytoplasmic carboxy* terminal yang panjang. *Latent membrane Protein-1* memodulasi NF- κ B dan JAK oleh aktivitas daerah terminal karbon 1 dan 2 yang menyebabkan proliferasi sel menjadi tidak terkontrol, menghambat proses apoptosis limfosit B, yang diperantarai P53, memodulasi aktivitas p53 dengan menginduksi TNFAIP3/A20 yang berfungsi untuk menghambat apoptosis, juga merangsang ekspresi Mdm2 yang mempromosikan penurunan p53, dan dapat menekan transkripsi p53. *Latent Membrae Protein-1* juga dapat bersinergi dengan *bcl-2* untuk menekan pertumbuhan yang disebabkan oleh *wild type p53*.^{15, 22-26}

p53 merupakan salah satu dari gen supresor tumor yang dapat mendeteksi kerusakan DNA, membantu perbaikan DNA melalui penghentian fase G1 dari siklus sel. *Latent Membrae Protein-1* merupakan protein VEB yang pertama ditemukan, dapat mentransformasi galur sel dan merubah fenotip sehingga mencegah sel yang terinfeksi VEB dari apoptosis dengan menginduksi protein anti-apoptosis seperti BCL-2, A20 dan MCL-1. *Latent Membrae Protein-1* juga terlibat dalam jalur persinyalan yang mengatur proliferasi sel dan anti-apoptosis, yaitu memicu progresifitas dan proliferasi sel melalui siklus sel (fase G1/S) dan inhibisi apoptosis yang dimediasi p53.²²⁻²⁶

Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup, menentukan lokalisasi, dan karakterisasi suatu antigen tertentu, serta menentukan diagnosis, terapi, dan prognosis kanker.^{35, 37}

Laten membrane protein-1 melalui empat jalur sinyal yaitu NF- κ B, JNK/AP1, P38/MAPK dan Jak/STAT menyebabkan transformasi sel yang dapat menginduksi imortalitas, menghambat apoptosis, meningkatkan proliferasi sel, invasi dan metastasis yang mempengaruhi stadium tumor. Pertumbuhan tumor salah satunya disebabkan oleh ketidakseimbangan proliferasi dengan apoptosis yang dimediasi oleh p53. Pada KNF terdapat peningkatan kadar p53, berkorelasi dengan peningkatan LMP-1 yang menghambat pengaruh penekanan wild type p53 sehingga terjadi pertumbuhan dan progresifitas tumor.²²⁻²⁵

Berdasarkan kerangka pemikiran di atas, maka dibuatlah premis-premis sebagai berikut :

- Premis 1 : Karsinoma nasofaring tipe III berhubungan 100% dengan virus Epstein Barr.^{8,10}
- Premis 2 : Fase laten VEB mengekspresikan protein virus EBNA-1, LMP-1, LMP-2, LMP2A.¹⁵
- Premis 3 : *Latent Membrane Protein-1* diekspresikan pada fase laten dan memegang peran penting dalam aktifitas transformasi sel.¹⁵
- Premis 4 : *Latent Membrane Protein-1* mencegah sel terinfeksi VEB dari apoptosis yang dimediasi p53 dengan menginduksi protein anti-

apoptosis seperti BCL-2, A20, dan MCL-1 serta NF- κ B, menyebabkan proliferasi sel tumor tidak terkontrol dan tumbuh lebih cepat.^{22, 23}

Premis 5 : Pada KNF terjadi inaktivasi gen supresor tumor p53 sehingga terbentuk protein p53 mutan yang tidak stabil dan menyebabkan proliferasi yang tidak dapat dikendalikan²⁹

Premis 6 : *Latent Membrane Protein-1* menginduksi peningkatan ekspresi NF- κ B melalui pengikatan *tumor necrosis factor-associated factors* sehingga menyebabkan aktifnya proliferasi dan jalur survival yang melibatkan p53.²³⁻²⁵

Premis 7 : Peningkatan ekspresi LMP1 dan p53 akan menyebabkan pertumbuhan sel tumor menjadi lebih cepat.²⁵

Premis 8 : *Laten membrane protein-1* melalui empat jalur sinyal yaitu NF- κ B, JNK/AP1, P38/MAPK dan Jak/STAT menyebabkan transformasi sel yang dapat menginduksi imortalitas, menghambat apoptosis, meningkatkan proliferasi sel, invasi dan metastasis yang mempengaruhi progresifitas stadium tumor.²³⁻²⁵

2.5 Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran dan premis di atas maka dibuat sebuah hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP1 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring. (Premis :1-4)

2. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring. (Premis :5-6)
3. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP1 dan p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring. (Premis : 1-8)

BAB III

SUBJEK, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

3.1 Subjek dan Alat Penelitian

3.1.1 Subjek Penelitian

Subjek penelitian merupakan data sekunder berupa rekam medis, preparat, dan blok parafin semua penderita karsinoma nasofaring yang sesuai kriteria inklusi dan eksklusi di RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung.

3.1.1.1 Kriteria Inklusi

1. Penderita yang didiagnosis karsinoma nasofaring berdasarkan hasil patologi anatomi.
2. Penderita karsinoma nasofaring yang belum mendapatkan terapi radioterapi maupun kemoterapi.

3.1.1.2 Kriteria Eksklusi

1. Penderita karsinoma nasofaring residif atau rekuren.
2. Penderita karsinoma nasofaring dengan karsinoma multipel.

3.1.1.3 Besar Sampel

Penentuan besar sampel ditentukan dengan rumus besar sampel untuk analisis korelasi, yaitu :⁴³

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{\left\{ \frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+r}{1-r} \right) \right\}^2} + 3$$

keterangan :

Z_{α} : nilai Z yang diperoleh dari tabel distribusi normal, standar untuk taraf kepercayaan 95% yaitu 1,65 (uji satu pihak)

Z_{β} : *power test* = 0,84

τ : koefisien korelasi, hasil penelitian ditetapkan koefisien analitik yang bermakna secara statistik $\tau = 0,5$

Maka diperlukan besar sampel sebanyak 23 orang.

3.1.2 Bahan dan Alat yang Digunakan Penelitian

3.1.2.1 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang dipergunakan dalam penelitian ini :

1. Parafin blok yang dilakukan teknik pewarnaan imunohistokimia untuk dinilai ekspresi LMP1 dan p53 pada sel tumor oleh dokter Patologi Anatomi di Bagian Patologi Anatomi RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung.
2. Pemeriksaan imunohistokimia untuk LMP1 mempergunakan antibodi monoklonal CS1-4 Dako.
3. Pemeriksaan imunohistokimia untuk p53 mempergunakan antibodi monoklonal p53 Dako.

3.1.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini :

1. Blok parafin.
2. Rekam medis.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah suatu penelitian observasional analitik dengan rancangan studi silang.⁴⁷

3.2.2 Identifikasi Variabel

3.2.2.1 Variabel Penelitian

Variabel yang diukur pada penelitian ini :

1. Variabel dependen yaitu stadium klinis karsinoma nasofaring.
2. Variabel independen yaitu imunoekspresi LMP1 dan imunoekspresi p53.
3. Variabel perancu yaitu usia, jenis kelamin.

3.2.2.2 Definisi Operasional

1. Stadium klinis karsinoma nasofaring

Definisi : Suatu sistem klasifikasi yang di kembangkan oleh *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) untuk menjelaskan ekstensi maupun progresifitas penyakit pada pasien karsinoma nasofaring dengan menggunakan sistem penilaian TNM (ukuran tumor, KGB yang terlibat, maupun metastasis).^{1,3}

Alat Ukur : Penentuan stadium terbaru karsinoma nasofaring berdasarkan UICC (*Union Internationale center Cancer*) dan AJCC (*American*

Joint Committee on Cancer) pada tahun 2013 adalah sebagai berikut : ^{1,3}

Cara Ukur :

1. T : Tumor, menggambarkan keadaan tumor primer, besar dan perluasannya.
 - Tx : Tumor primer tidak dapat dinilai.
 - T0 : Tumor primer tidak ditemukan.
 - Tis : Karsinoma *in situ*.
 - T1 : Tumor terbatas di nasofaring, atau tumor meluas ke orofaring dan / atau kavum nasi tanpa ekstensi parafaring.
 - T2 : Tumor dengan ekstensi ke parafaring.
 - T3 : Tumor invasi ke struktur tulang dari dasar tengkorak, dan / atau sinus paranasal.
 - T4 : Tumor dengan ekstensi ke intrakranial dan atau mengenai syaraf pusat, hipofaring, orbita, atau ekstensi ke fossa intratemporal atau ruang mastikator.
2. N = Nodul, menggambarkan keadaan kelenjar limfe regional
 - NX : Kelenjar getah bening tidak dapat dinilai.
 - N0 : Tidak ditemukan metastasis ke kelenjar getah bening.
 - N1 : Metastasis unilateral pada kelenjar getah bening(s), berukuran ≤ 6 cm dan diatas fossa supraklavikula, dan atau unilateral atau bilateral, kelenjar getah bening retrofaring, ≤ 6 cm dan atau ke

fosa supraklavikula.

N2 : metastasis ke kelenjar getah bening bilateral, berukuran ≤ 6 cm dan diatas fossa supraklavikula.

N3 : metastasis ke kelenjar getah bening, berukuran > 6 cm dan atau ke fossa supraklavikula.

N3a : Kelenjar getah bening berukuran > 6 cm.

N3b : Ekstensi ke fossa supraklavikula.

3. M = Metastasis, menggambarkan metastasis jauh

M0 : tidak ada metastasis jauh

M1 : terdapat metastasis jauh

Hasil Ukur : Stadium 0 : Tis N0 M0

Stadium I : T1 N0 M0

Stadium II : T1 N1 M0

T2 N0 M0

T2 N1 M0

Stadium III : T1 N2 M0

T2 N2 M0

T3 N0 M0

T3 N1 M0

T3 N2 M0

Stadium IVA : T4 N0 M0

T4 N1 M0

T4 N2 M0

Stadium IV B: Tiap T N3 M0

Stadium IV C: Tiap T Tiap N M1

Skala Ukur : Kategorik Ordinal yaitu stadium 1 sampai 4

2. *Latent Membrane Protein-1 (LMP-1)*

Definisi : Protein yang dikodekan VEB untuk immortalisasi sel B, dan diekspresikan pada fase laten pada proses karsinogenesis KNF.

Cara Ukur : Pemeriksaan Imunohistokimia menggunakan *mouse monoclonal anti Epstein Barr virus LMP-1 antibody* Dako.

Hasil Ukur: Imunoekspresi LMP-1 dinyatakan positif bila sitoplasma dan membran sel tumor berwarna coklat. Distribusi 0= Tidak ada sel yang positif, 1=Sel yang positif $\leq 10\%$, 2=Sel yang positif 11-50%, dan 3=Sel yang positif 51-80%, 4=Sel yang positif $\geq 80\%$ intensitas ; 0=Tidak ada warna, 1=Ada warna, intensitas lemah(coklat muda/pucat), 2=Ada warna intensitas sedang (coklat), dan 3=Ada warna intensitas kuat (coklat tua). Histoskor/skor akhir adalah perkalian antara distribusi dengan intensitas, yaitu : skor 0= Negatif, 1-2= Positif lemah, 3-4= Positif sedang, dan 6-12= Positif kuat.

Skala Ukur : Kategorik Ordinal, yaitu Skor 0 sampai 12.

3. Protein 53 (p53)

Definisi : Supressor tumor dan mengalami perubahan pada keganasan yang mengenai manusia, aktifitasnya meliputi regulasi siklus sel, induksi

apoptosis, perkembangan, diferensiasi, aplikasi gen, DNA *recombinant*, *segregasi* kromosom, dan penuaan sel.

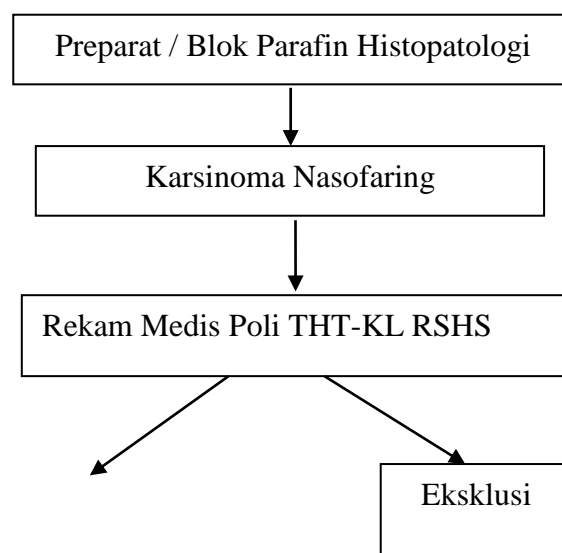
Cara Ukur :Pemeriksaan Imunohistokimia menggunakan *mouse monoclonal anti Epstein Barr virus LMP-1 antibody* Dako.

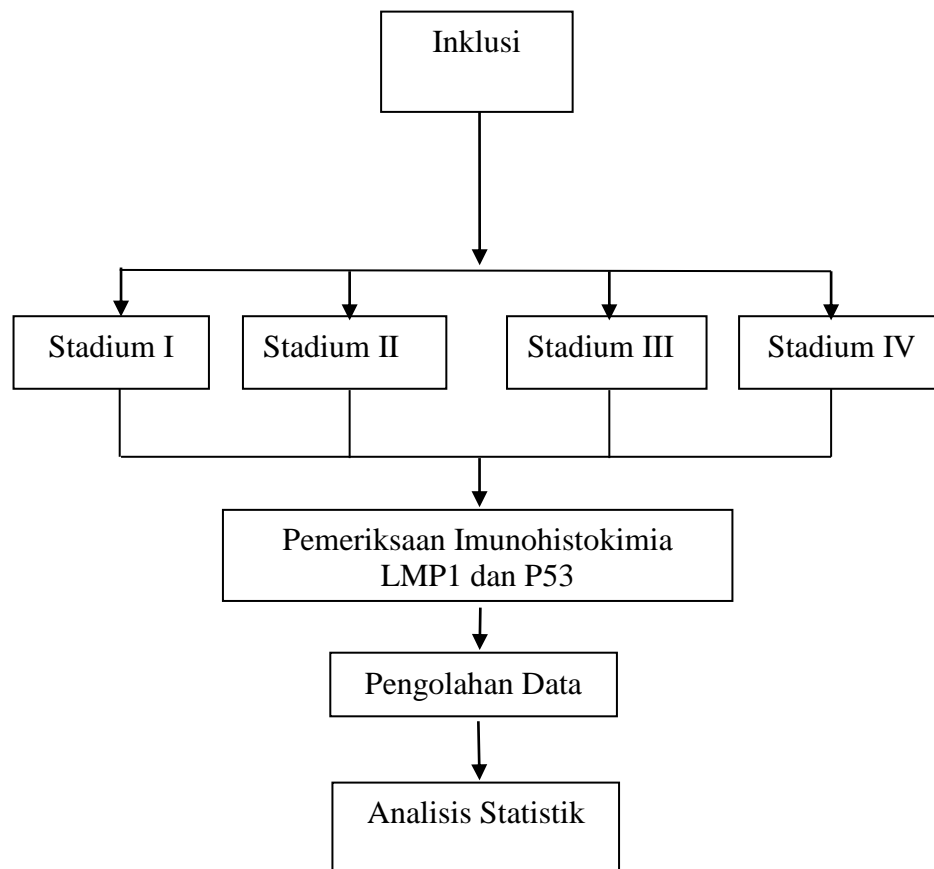
Hasil Ukur:Imunoekspresi LMP-1 dinyatakan positif bila inti sel tumor berwarna coklat. Distribusi 0= Tidak ada sel yang positif, 1=Sel yang positif $\leq 10\%$, 2=Sel yang positif 11-50%, dan 3=Sel yang positif 51-80%, 4=Sel yang positif $\geq 80\%$ intensitas ; 0=Tidak ada warna, 1=Ada warna, intensitas lemah(coklat muda/pucat), 2=Ada warna intensitas sedang (coklat), dan 3=Ada warna intensitas kuat (coklat tua). Histoskor/skor akhir adalah perkalian antara distribusi dengan intensitas, yaitu : skor 0= Negatif, 1-2= Positif lemah, 3-4= Positif sedang, dan 6-12= Positif kuat.

Skala Ukur:Kategorik Ordinal, yaitu Skor 0 sampai 12

3.2.3 Alur Kerja dan Teknik Pengumpulan Data

3.2.3.1 Alur Kerja





3.2.3.2 Prosedur Pembuatan Pulasan Imunohistokimia LMP-1 dan p53

Pulasan imunohistokimia LMP-1 dan p53 dilakukan dengan prosedur manual sebagai berikut :

1. Preparat dipanaskan pada hotplate dengan suhu 56-60 C selama 10 menit.
2. Dibiarkan selama 1 malam dalam inkubator 37 C.
3. Deparafinisasi dengan Xylol 3x @ 5 menit.
4. Celupkan ke dalam Alkohol 100% (etanol) 3x @ 5 menit.
5. Celupkan ke dalam Alkohol 90%, 80% dan 70% 1x @ 5 menit

6. Bilas dengan air mengalir.
7. Direndam dalam H₂O₂ 0.3% dalam metanol selama 15 menit.
8. Rendam dalam air mengalir 5 menit.
9. Masukkan ke dalam cairan buffer citrate, lalu masukkan ke dalam decloacking chamber selama 30 menit.
10. Tunggu hingga suhu ruangan.
11. Dilingkari sebagai tanda dengan Pap pen pada sekitar jaringan yang akan diperiksa.
12. Cuci dengan PBS 5 menit.
13. Teteskan blocking serum dan inkubasi 10 menit.
14. Teteskan antibodi primer monoclonal LMP-1 pada sediaan lalu inkubasi 1 jam.
15. Dicuci dengan PBS pH 7.2-7.42 x @ 5 menit.
16. Ditetesi antibodi sekunder dan inkubasi 10-20 menit.
17. Dicuci dengan PBS pH 7.2-7.42 x @ 5 menit.
18. Ditetesi strektravidin hrp dan inkubasi 10-20 menit.
19. Dicuci dengan PBS pH 7.2-7.42 x @ 5 menit.
20. Ditetesi larutan kromogen DAB, inkubasi selama 5 menit.
21. Dicuci dengan air mengalir 5 menit.
22. Diwarnai counterstaining dengan pewarnaan Meyer hematoksilin selama 2 menit.
23. Dicuci dengan air mengalir 5 menit.
24. Celupkan dalam LiCO₃.

25. Dicuci dengan air mengalir.
26. Alkohol 70%, 80%, 90% 1x @ 5 menit.
27. Alkohol 100% / ethanol 5 menit.
28. Masukkan ke dalam Xylol selama 3 menit.
29. Teteskan entelan, kemudian tutup dengan kaca penutup dan biarkan mengering pada suhu ruangan.
30. Lihat dibawah mikroskop sitoplasma dan membran sel tumor berwarna coklat.
Tahapan dan proses yang sama dilakukan terhadap pewarnaan imunohistokimia p53.

3.2.3.3 Teknik Pengumpulan Data

Setiap preparat dan blok parafin yang telah di diagnosis berdasarkan histopatologis di bagian Patologi Anatomi RS. Hasan Sadikin Bandung, dilakukan pemeriksaan imunohistokimia secara tidak langsung dengan menggunakan *mouse monoclonal anti Epstein Barr virus LMP-1 antibody* Dako sedangkan pemeriksaan imunohistokimia p53 menggunakan *mouse monoclonal p53 antibody* Dako. Setelah didapatkan hasil imunohistokimia, dilakukan penilaian kemudian dilihat hubungan peningkatan ekspresi LMP1 dan p53 terhadap stadium klinis karsinoma nasofaring.

3.2.3.4 Evaluasi Hasil Pulasan Imunohistokimia LMP-1 dan p53

Setelah dilakukan pulasan imunohistokimia, selanjutnya dilakukan penilaian terhadap hasil pulasan. Imunoekspresi LMP-1 dinyatakan positif bila sitoplasma

dan membran sel tumor berwarna coklat.⁵³ Imunoekspresi p53 dinyatakan positif bila sitoplasma dan membran sel tumor berwarna coklat. Perhitungan sel tumor yang mempunyai imunoekspresi LMP-1 dan p53 dilihat menggunakan mikroskop cahaya merk Olympus tipe CX21 dengan pembesaran lensa objektif 40x secara random sampling diambil 10 lapangan pandang. Hasil yang dilaporkan adalah presentase sel terpulsa (distribusi) serta intensitas pulsan berupa skor.^{35,40-41}

3.2.4 Rancangan Analisis

Data yang diperoleh akan dicatat dalam formulir penelitian dan hasilnya disajikan dalam bentuk tabel, untuk mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 terhadap stadium klinis karsinoma nasofaring, dilakukan analisis korelasi Kruskal-Wallis Test, sedangkan untuk mengetahui hubungan X1, X2 secara simultan digunakan analisis regresi ganda, kemaknaan hasilnya ditetapkan berdasarkan nilai $p < 0,005$.

3.2.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok Bedah Kepala Leher dan Bagian Ilmu Patologi Anatomi RS Dr. Hasan Sadikin Bandung. Waktu penelitian dilakukan mulai bulan Juni sampai dengan Agustus 2014.

3.3 Aspek Etik Penelitian

Penelitian ini menggunakan data sekunder yaitu blok parafin dari Bagian Patologi Anatomi RS. Dr. Hasan Sadikin dan rekam medis yang akan dikerjakan apabila sudah mendapatkan surat *clearance* dari Komite Etika Penelitian FK UNPAD / RSHS. Aspek etik pada penelitian ini adalah terjaganya kerahasiaan hasil diagnosis dari sampel blok parafin yang digunakan dalam penelitian, hanya diketahui oleh peneliti dan terjamin kerahasiaannya.

Sampel blok parafin akan diperlakukan dengan penuh rasa tanggung jawab sejak proses pengumpulan blok sampai penelitian ini selesai, dan akan dikembalikan ke tempat penyimpanan di gudang blok parafin laboratorium Histopatologi Bagian Patologi Anatomi.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 terhadap stadium klinis karsinoma nasofaring.

Kegiatan yang dilakukan demi menjaga etik dan kerahasiaan informasi mengenai penyakit penderita, yaitu :

1. Penggunaan catatan rekam medis untuk kepentingan penelitian akan dilaksanakan setelah ada izin dari pihak yang berwenang di RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung.
2. Sediaan blok parafin dari hasil biopsi massa tumor disimpan di Laboratorium Patologi Anatomi RS. Hasan Sadikin Bandung dan penggunaannya untuk penelitian setelah ada izin dari Kepala Departemen Patologi Anatomi RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung.
3. Dana yang digunakan dalam penelitian ini berupa pemeriksaan imunohistokimia ditanggung oleh peneliti.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian dan Pembahasan

Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia yang dilakukan terhadap 23 blok parafin patologi anatomi penderita karsinoma nasofaring di bagian Ilmu Kesehatan Patologi Anatomi yang telah berobat di poliklinik Ilmu Kesehatan THT-KL RS Hasan Sadikin Bandung.

4.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik umum penderita karsinoma nasofaring yang menjadi subjek penelitian meliputi jenis kelamin, usia, dan stadium terhadap 23 data rekam medis dan blok parafin patologi anatomi penderita karsinoma nasofaring.

Dari tabel 4.1 distribusi subjek berdasarkan jenis kelamin didapatkan perbandingan antara laki dengan perempuan adalah 2 : 1 dengan 14 orang laki-laki yang terdiri dari 3 orang pada stadium awal dan 11 orang pada stadium lanjut sedangkan perempuan sebanyak 9 orang yang keseluruhan pada stadium lanjut dengan nilai $p=0,455$.

Pada distribusi usia yang terbagi atas dua stadium, didapatkan pada stadium awal sebanyak 1 orang dengan usia < 20 tahun dan 2 orang dengan usia 31-40 tahun dengan rerata 28,3, median 33 dan rentang 15-37. Pada stadium lanjut didapatkan 3 orang dengan usia 21-30, sebanyak 8 orang dengan usia 31-40, 5 orang dengan usia 41-50 dan 4 orang dengan usia >50, dengan rerata 40,6, median 38,5 dan rentang 22-36. Nilai p untuk usia adalah 0,368.

Distribusi subjek penelitian berdasarkan stadium terdiri dari 3 orang pada stadium awal dan 20 orang pada stadium lanjut.

Tabel 4.1 Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik	Kelompok penelitian		Nilai p
	KNF Stadium Awal (I-II)	KNF Stadium Lanjut (III-IV)	

Jenis Kelamin			
- Laki-laki	3	11	0,455
- Perempuan	0	9	
Usia (tahun)			
≤ 20	1	0	0,368
21-30	0	3	
31-40	2	8	
41-50	0	5	
>50	0	4	
Rerata (SD)	28,3(11,03)	40,6(12,15)	
Median	33	38,5	
Rentang	15-37	22-63	

Ket : SD = standar deviasi, nilai $p < 0,05$ = bermakna

4.1.2 Hasil Pemeriksaan Ekspresi LMP-1 dan P53 pada penderita Karsinoma Nasofaring

Hasil pemeriksaan ekspresi LMP-1 dan P53 pada penderita KNF yang dilakukan pemeriksaan imunohistokimia berdasarkan tabel 4.2, didapatkan hasil bahwa ekspresi LMP-1 berdasarkan hasil imunohistokimia yang dinilai dengan melihat warna kecoklatan pada sitoplasma didapatkan berdasarkan distribusi 11-50% sebanyak 5 orang (22%), distribusi 51-80% 8 orang (35%) dan 10 orang (43%) pada distribusi > 80%, sedangkan penilaian berdasarkan intensitas didapatkan intensitas lemah sebanyak 1 orang (4%), intensitas sedang sebanyak 8 orang (35%) dan intensitas kuat sebanyak 14 orang (61%), dengan histoskor LMP-1 yaitu rerata (SD) : 8,3, median : 9 dan rentang : 2-12.

Hasil pemeriksaan imunohistokimia terhadap P53 dengan melihat warna coklat pada inti didapatkan hasil berdasarkan distribusi ≤10% sebanyak 1 orang

(4%), distribusi 11-50% sebanyak 5 orang (22%), distribusi 51-80% sebanyak 9 orang (39%) dan 8 orang (35%) pada distribusi > 80%, sedangkan berdasarkan intensitas didapatkan sebanyak 1 (4%) intensitas lemah, 7 (30%) sedang dan kuat sebanyak 15 (65%), dengan histoskor p53 yaitu rerata (SD) : 8,0, median : 9, dan rentang : 1-12.

Tabel 4.2 Hasil Pemeriksaan Ekspresi LMP-1 dn P53 pada penderita Karsinoma

Ekspresi	Jumlah	%
-----------------	---------------	----------

 1. LMP-1

a. Distribusi :

11-50 %	5	22
51-80 %	8	35
>80 %	10	43

b. Intensitas :

1	1	4
2	8	35
3	14	61

Histoskor LMP-1 :

Rerata (SD) : 8,3 (2,7)

Median : 9

Rentang : 2 – 12

2. P53

a. Distribusi :

≤ 10 %	1	4
11-50 %	5	22
51-80 %	9	39
> 80%	8	35

b. Intensitas :

1	1	4
2	7	30
3	15	65

Histoskor P53 :

Rerata (SD) : 8,0 (2,8)

Median : 9

Rentang : 1 – 12

 Keterangan : SD = Standar deviasi

4.1.3 Perbandingan Histoskor LMP-1, P53 berdasarkan Stadium Klinis

Hasil tabel 4.3 memberikan gambaran tentang perbandingan histoskor LMP-1, P53 berdasarkan stadium klinis, dengan hasil median histoskor antara LMP-1 dengan stadium I-II adalah skor 8 dengan rentang skor 6-9, sedangkan pada stadium III-IV adalah skor 8 dengan rentang skor 2-12. Sedangkan median histoskor P53 terhadap stadium I-II adalah skor 4 dengan rentang skor 1-4, dan untuk stadium III-IV adalah skor 9 dengan rentang skor 6-12. Dengan uji

statistik Kruskal-Wallis diperoleh perbandingan histoskor LMP-1 berdasarkan stadium klinis dengan nilai $p=0,043$ dan perbandingan histoskor P53 berdasarkan stadium klinis dengan nilai $p=0.013$, terdapat hubungan bermakna antara perbandingan histoskor LMP-1, p53 berdasarkan stadium klinis.

Tabel 4.3 Perbandingan histoskor LMP-1, P53 berdasarkan Stadium Klinis

Variabel	Stadium klinis		Nilai p*
	I-II (n=3)	III-IV (n=20)	
1. Histoskor LMP-1 :			0,043
Median	8	9	
Rentang	6-9	2-12	
2. Histoskor P53 :			0,013
Median	4	9	
Rentang	1-4	6-12	

Keterangan : *) Uji Kruskal-Wallis

4.1.4 Hubungan antara Histoskor LMP-1 dan P53 dengan Stadium Klinis

berdasarkan Analisis regresi ganda

Pada tabel 4.5 menjelaskan tentang hubungan antara histoskor LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis berdasarkan analisis regresi ganda, dengan hasil koefisien B histoskor LMP-1 = 0,055, nilai $t = 1,19$ dan nilai $p = 0,248$, koefisien B histoskor P53 = 0,20, nilai $t = 4,358$ dan nilai $p = <0,001$. Dengan uji Anova di dapatkan nilai statistik Fischer = 11,727 dan nilai signifikan 0,000, dan model regresi hubungan diformulasikan dalam bentuk persamaan regresi, yaitu :

Persamaan regresi :

$$\text{Stadium klinis} = 1,234 + 0,055 * \text{histoskor LMP-1} + 0,20 * \text{histoskor P53}$$

Tabel 4.4 Hubungan antara histoskor LMP-1 dan P53 dengan Stadium

Klinis berdasarkan Analisis regresi ganda

Variabel	Koefisien B	SE (B)	Nilai t	Nilai p	Uji Anova
Histoskor LMP-1	0,055	0,047	1,19	0,248	F = 11,727 p = 0,000
Histoskor P53	0,20	0,046	4,358	<0,001	
Konstanta	1,234	-	2,504	0,021	

Keterangan : r^2 (%) = 54,0 % ; SE = standar error

4.2 Pembahasan

Data karakteristik dari hasil penelitian menunjukkan penderita KNF lebih banyak ditemukan pada laki-laki dibandingkan dengan wanita, yaitu sebesar 2:1. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Putri EB, tahun 2011 di RSHS Bandung mengenai karakteristik penderita karsinoma nasofaring di departemen Ilmu Kesehatan THT-KL FKUP/RSHS pada periode tahun 2006-2010, dimana didapatkan perbandingan laki dengan perempuan 2:1 dengan laki sebanyak 324 orang (65%) dan perempuan sebanyak 169 orang (34,3%), Altila Y, tahun 2012 di RSHS Bandung dalam Tesis mengenai pengaruh radioterapi eksterna terhadap nilai ambang eksitabilitas nervus fasialis pada terapi radiasi penderita karsinoma nasofaring didapatkan perbandingan antara laki dan perempuan 5:1 dari 26 orang subjek penelitian, Rusdiana dkk, tahun 2006 di RS Haji Adam Malik Medan

dalam penelitiannya tentang hubungan antibodi anti Epstein Barr Virus dengan karsinoma nasofaring pada pasien etnik batak di medan mendapatkan perbandingan antara laki-laki dengan perempuan sebesar 2:1, dan Tabyaoui dkk, tahun 2013 di Maroko dalam penelitiannya didapatkan perbandingan antara laki-laki dengan perempuan adalah 2,28:1 dari 23 orang subjek penelitiannya.

Semua penelitian sebelumnya sesuai dengan penelitian ini dengan kejadian KNF pada laki-laki lebih banyak dari perempuan disebabkan karena kebiasaan merokok laki-laki lebih tinggi daripada perempuan dan sering terpapar oleh zat karsinogen seperti alkohol, tembakau dan asap rokok serta bekerja pada tempat dengan ventilasi yang kurang baik. Hal ini juga yang menjadikan penderita dengan stadium lanjut banyak ditemukan pada jenis kelamin laki-laki.^{10,}

12, 35

Kelompok usia terbanyak pada penelitian ini adalah 31-40 tahun sebanyak 8 subjek dan usia 40-50 tahun sebanyak 5 subjek dengan rerata 40,6, median 38,5 dan rentang 22-36. Hal ini sesuai dengan penelitian Rusdiana dkk, di Medan dengan penderita terbanyak pada dekade 3-5 sebanyak 30,79%, Altila Y di RSHS Bandung dengan penderita terbanyak pada dekade 4-5 sebanyak 11 dari 26 subjek, Adham M dkk di RSCM Jakarta dengan usia terbanyak dekade 4-5 sebanyak 32,4% dan Cao S M dkk di Cina didapatkan usia terbanyak penderita KNF adalah dekade 4-6. Hal ini dapat disebabkan karena faktor lingkungan, konsumsi ikan asin dan paparan zat karsinogenik yang cukup lama seperti asap rokok.^{5, 8, 12, 48,}

Dari tabel 4.1 juga didapatkan sebanyak 1 orang usia < 20 tahun dengan stadium awal karsinoma nasofaring. Hasil ini sesuai dengan penelitian Khabir dkk di Afrika tahun 2005 yang meneliti tentang *latent membrane protein-1* (LMP1) hubungannya dengan usia dengan melakukan pemeriksaan imunohistokimia pada penderita karsinoma nasofaring. Dengan metoda imunohistokimia yang menggunakan antibodi S12 yang lebih sensitif pada 82 penderita KNF. Hasil penelitiannya didapatkan usia < 30 tahun sebanyak 22 orang dan usia > 30 tahun sebanyak 66 orang dengan nilai $p=0,004$ mempergunakan uji statistik t-test, dan disimpulkan bahwa terdapat ekspresi LMP-1 yang tinggi pada pasien KNF usia muda. Hal ini dapat terjadi karena VEB dapat mengenai hampir 90% populasi dan dari penelitian epidemiologi menunjukkan hubungan yang kuat antara peningkatan konsumsi bahan makanan berupa ikan atau udang yang diawetkan dengan garam (diasinkan), seperti ikan asin, pindang asin, udang asin, atau yang dikeringkan dengan pengasapan seperti penduduk di daerah Canton, China selatan, China Utara, dan Thailand yang memiliki kebiasaan mengkonsumsi ikan asin sejak kecil yang dikenal sebagai *Cantonese salted fish* dan makanan yang mengandung nitrosodimethyamine (NDMA), N-nitrosopyrolididene (NPYR), serta nitrospiperidine (NPIP) yang merupakan zat karsinogen.^{1, 5, 7-9, 32}

Berdasarkan UICC (*Union Internationale center Cancer*) dan AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) pada tahun 2013, stadium klinis pada penelitian ini terbanyak pada stadium lanjut yaitu stadium III sebanyak 39% dan stadium IV sebanyak 48%. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh

Permana AD dan Katherine dkk yang menyatakan sebagian besar penderita karsinoma nasofaring datang berobat sudah dengan stadium lanjut. Dari semua penelitian yang ada menunjukkan bahwa penderita KNF selalu datang pada stadium lanjut, hal ini disebabkan KNF sulit untuk didiagnosis karena letak nasofaring yang tersembunyi dibelakang rongga hidung dan gejala klinis yang tidak khas. Gejala dini KNF mirip dengan infeksi saluran nafas atas. Gejala klinik stadium awal meliputi gejala hidung dan telinga karena tumor terbatas pada mukosa nasofaring dengan predileksi tersering pada *fossa Rosenmuller* dan meluas ke dinding belakang dan atap nasofaring, sedangkan pada stadium lanjut gejala klinis lebih jelas sehingga pada umumnya telah dirasakan oleh pasien, karena tumor primer telah meluas ke organ sekitar nasofaring atau bermetastasis regional ke kelenjar getah bening servikal.^{1, 8, 45, 49}

Dari hasil histoskor, LMP-1 dan P53 memberikan hasil imunoekspresi positif kuat. Hal ini sesuai dengan penelitian Kurniawan AN tahun 2000 di Jakarta tentang overekspresi p53 pada penderita karsinoma nasofaring di Indonesia dengan mempergunakan pemeriksaan imunohistokimia, yang mendapatkan hasil bahwa ekspresi p53 ditemukan positif pada karsinoma menurut WHO tipe I, II, dan III berturut turut sebanyak 100%, 82,6% dan 62,5%, dari 48 kasus KNF, Taweevisit dkk di Bangkok tahun 2007 melakukan peneliti tentang p53 dalam korelasinya dengan undiferensiasi karsinoma nasofaring, yang dilakukan di RS King Chulalongkorn, Bangkok dari tahun 2001-2005. Penelitian ini dilakukan terhadap 60 blok parafin pasien karsinoma nasofaring dengan pemeriksaan imunohistokimia p53 dan Ki67. Didapatkan KNF stadium IV yang terbanyak

(35%) dan didapati ekspresi p53 sebanyak 73%. Disimpulkan bahwa tingginya ekspresi p53 dengan jumlah penderita undiferensiasi KNF terdapat hubungan yang signifikan dengan tingginya proliferasi sel tumor.³³

Khabir A dkk mendapatkan hasil histoskor imunoekspresi LMP-1 pada 82 pasien KNF dengan median 7,6 dan rentang 2-12, Yenita dkk di Padang tahun 2012 melakukan penelitian untuk mengetahui korelasi antara LMP1 VEB dengan ekspresi p53 pada KNF terhadap 49 blok parafin dari penderita KNF yang dianalisis dan dipulas secara imunohistokimia dengan antibodi LMP1 VEB dan p53. Korelasi antara ekspresi LMP1 dengan ekspresi p53 diuji dengan menggunakan uji Korelasi Pearson, dengan hasil terdapat korelasi yang lemah antara LMP1 dengan ekspresi p53 ($p < 0,05$) dan berpola positif.³⁴

Hal ini disebabkan karena LMP-1 merupakan onkogen yang menyebabkan transformasi sel dan berperan dalam aktivasi proliferasi dan ketahanan sel sehingga menjadi imortal dan dapat mencegah apoptosis. Ekspresi p53 yang tinggi pada penderita KNF dibandingkan dengan tumor kepala leher lainnya disebabkan hilangnya fungsi protektif.^{23-25, 32-34}

Perbandingan histoskor LMP-1, P53 berdasarkan stadium klinis awal dan lanjut dengan uji statistik Kruskal-Wallis didapatkan histoskor LMP-1 dengan median skor 8 pada stadium awal dan skor 9 pada stadium lanjut dengan nilai $p = 0,043$ yang berarti signifikan terdapat hubungan yang bermakna antara ekspresi LMP-1 dengan peningkatan stadium klinis dapat disimpulkan bahwa ekspresi LMP-1 meningkat lebih tinggi pada stadium lanjut dibandingkan pada stadium awal, untuk histoskor P53 didapatkan median skor 4 pada stadium awal dan skor 9

pada stadium lanjut dengan nilai $p=0,013$ yang berarti signifikan terdapat hubungan peningkatan ekspresi p53 dengan stadium klinis dengan kesimpulan bahwa ekspresi p53 meningkat pada stadium lanjut dibandingkan stadium awal.. Hal ini sesuai dengan penelitian Permana AD dan Kurniawan dkk yang dalam penelitiannya didapatkan adanya hubungan yang bermakna antara ekspresi LMP-1 dengan stadium klinis KNF serta p53 dengan stadium klinis.⁴⁵

Hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis berdasarkan analisis regresi ganda didapatkan hasil histoskor LMP-1 dengan koefisien $B = 0,005$, nilai $t = 1,19$ dan nilai $p = 0,248$, histoskor P53 dengan koefisien $B = 0,20$, nilai $t = 4,358$ dan nilai $p < 0,001$ dan konstanta dengan koefisien $B = 1,234$. Persamaan regresi yaitu Stadium klinis = $1,234 + 0,055 \cdot \text{histoskor LMP-1} + 0,20 \cdot \text{histoskor p53}$. Pada uji statistik Anova di dapatkan nilai Fischer 11,727 dan Sig. 0,000 pada model regression, yang berarti bahwa model analisis regresi ganda ini signifikan.

Pada penelitian ini didapatkan hasil terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis KNF yang bermakna berdasarkan uji analisis regresi ganda. Dari histoskor didapatkan skor 9 yang memberikan hasil positif kuat sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 dengan stadium klinis nasofaring adalah positif kuat. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Yenita dkk, yang mendapatkan hubungan peningkatan LMP-1 dan p53 berpola positif dengan korelasi lemah dengan menggunakan uji Korelasi Pearson.

Histskor 9 dapat juga dipergunakan sebagai indikator untuk prognosis karsinoma nasofaring, seperti hasil penelitian Hariwiyanto dkk di Yogyakarta melakukan penelitian dengan judul Ekspresi LMP1 EBV pada keberhasilan terapi dan tiga tahun ketahanan hidup penderita KNF, dengan hasil ketahanan hidup penderita KNF pasca terapi adalah ; penderita dengan ekspresi LMP-1 histoskor $< 7,2$ ketahanan hidupnya selama 3 tahun sebesar 85%, sedangkan penderita dengan histoskor $>7,2$, ketahanan hidup selama 3 tahun sebesar 30% dan kegagalan terapi juga lebih besar. Hal ini sesuai dengan teori LMP-1 menyebabkan transformasi sel melalui peningkatan regulasi gen antiapoptosis seluler yang berperan dalam aktivasi proliferasi dan ketahanan sel, sehingga sel menjadi imortal, mencegah apoptosis, menginduksi ekspresi EGFR pada sel epitel, produksi PGE2 serta memproduksi VEGF sehingga terjadi angiogenesis, limfangiogenesis, dan metastasis yang berhubungan dengan progresifitas stadium klinis .

Sebagian besar tumor KNF mengandung gen p53 yang berhubungan dengan ekspresi p53 antagonis dan LMP-1 yang memberikan kontribusi untuk sifat onkogenik yaitu kemampuannya untuk melindungi sel dari apoptosis. *Latent membrane protein-1* terlibat dalam pengaturan proliferasi sel dan apoptosis dengan memicu progresifitas dan proliferasi sel melalui siklus sel (fase G1/S) dan inhibisi apoptosis yang dimediasi p53, melalui jalur sinyal NF-kB. *Latent membrane protein-1* dapat memodulasi aktivitas p53 dengan menginduksi TNFAIP3/A20 yang berfungsi untuk menghambat p53 yang menyebabkan apoptosis dan merangsang ekspresi Mdm2, mempromosikan penurunan p53, dan

menekan transkripsi p53. *Latent Membrane Protein-1* juga dapat bersinergi dengan *bcl-2* untuk menekan pertumbuhan yang disebabkan oleh *wild type* p53.²³⁻²⁵

Meskipun LMP1 tidak menginduksi Bcl2 pada sel epitel, LMP-1 tidak merangsang TNFAIP3/A20, MCL-1, c-IAP2 (BIRC3), dan survivin (BIRC5), melalui mekanisme dependent NF- κ B/AP-1. Keterlibatan LMP1 dari jalur *phosphorylates* PI3-K/Akt dan inaktivasi *pro-apoptosis* Bad dan protein FOXO3a. *Latent Membrane Protein-1* juga melindungi sel-sel epitel terhadap *deprivation induced apoptosis* (anoikis) oleh peningkatan ekspresi $\alpha 5 \beta 1$ dan αV yang mengandung integrin. Induksi interleukin (IL-1/6/10) dan sitokin pro-inflamasi lainnya dapat melindungi LMP-1 mengekspresikan sel dari apoptosis melalui aktivasi berkelanjutan NF- κ B dan STAT3.²³⁻²⁵

4.3 Uji Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah :

1. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.
2. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.
3. Terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP1 dan p53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Dari hipotesis diatas dapat dirumuskan hipotesis statistik sebagai berikut :

Ho : tidak terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring

H₁ : terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring

Analisis statistik tes Anova dan Analisis regresi ganda (Tabel 4.4) didapatkan LMP-1 dengan nilai $p = 0,248$, P53 dengan nilai $p = < 0,001$, konstanta dengan koefisien $B = 1,234$ dan persamaan regresi yaitu Stadium klinis = $1,234 + 0,055 \cdot \text{histoskor LMP-1} + 0,20 \cdot \text{histoskor P53}$ serta nilai Fischer 11,727 dan Sig. 0,000. Berarti terdapat hubungan antara peningkatan ekspresi LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis karsinoma nasofaring.

Dari pengujian hipotesis diatas maka dapat disimpulkan bahwa secara statistik hipotesis penelitian diterima. Artinya bahwa peningkatan ekspresi LMP-1 akan meningkatkan stadium klinis karsinoma nasofaring, peningkatan ekspresi p53 akan meningkatkan stadium klinis karsinoma nasofaring dan peningkatan ekspresi LMP-1 dan p53 akan meningkatkan stadium klinis karsinoma nasofaring.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

5.1.1 Simpulan Umum

1. Terdapat hubunga antara peningkatan LMP-1 dengan stadium klinis KNF.
2. Terdapat hubungan antara peningkatan P53 dengan stadium klinis KNF.
3. Terdapat hubungan antara peningkatan LMP-1 dan P53 dengan stadium klinis KNF.

5.1.2 Simpulan Khusus

1. Karakteristik penderita KNF lebih banyak ditemukan pada laki-laki dan usia dekade 4-5.
2. Penderita KNF laki-laki banyak ditemukan sudah dengan stadium lanjut.
3. Penderita KNF usia muda didapatkan pada usia < 30 tahun
4. Stadium klinis terbanyak adalah stadium III dan IV.
5. Histoskor >7,2 memberikan prognosis buruk.

5.3 Saran

1. Pemeriksaan imunohistokimia LMP-1 dapat dijadikan pemeriksaan terhadap pasien KNF untuk menilai progresifitas penyakit.
2. Dilakukan penelitian biomolekuler KNF lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wei WI, Chua DT. 2014. Nasopharyngeal cancer. Dalam Bailey BJ, Healey GB, Johnson JT, Rosen CA dkk, penyunting. Head and neck surgery-otolaryngology. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Edisi ke-4:1875-1897.
2. Taheri Z. 2007. Nasopharyngeal carcinoma : past, present, and future directions. Departement of Oncology Institute of Clinical University, Sweden.
3. Forastiere A A et all. 2013. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology in Head and Neck Cancer. National Comprehensive Cancer Network. Version 2. NCCN.org.
4. Chong VF. 2006. Neoplasms of the Nasopharyng. Dalam Head and Neck Cancer Imaging. Spinger :143-161.
5. Cao SM, Simons MJ. 2011. The Prevalence and Prevention of Nasopharyngeal Carcinoma in China. Chinese Journal of Cancer.
6. Yusof AM. 2011. Nasopharyngeal Carcinoma Screening. Health Technology Assessment Section, Ministry of Health Malaysia. Malaysia.
7. Jia WH, Luo XY, & Zeng YX. 2010. Traditional Cantonese diet and nasopharyngeal carcinoma risk : a large scale case-control study in Guangdong, China. BMC Cancer, 10:446.
8. Adham M, Kurniawan AN, Muhtadi AI, Roezin A, Hermani B, Gondhowiardjo, Tri IB, Middeldrop. 2012. Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia : epidemiology, incidence, sign, and symptoms at presentation. Chin J Cancer, vol. 31(4)
9. Wildman MA. 2013. Current Problems and Possible Solution in The Treatment of Nasopharyngeal Carcinoma in Indonesia. The Institutional Respiratory of The University of Amsterdam.
10. Putri E B. 2011. Karakteristik Penderita Karsinoma Nasofaring Di Departemen Ilmu Kesehatan THT-KL FKUP/RSUP. DR. Hasan Sadikin Bandung Periode Tahun 2006-2010. Skripsi. Universitas Padjadjaran Fakultas Kedokteran, Bandung.
11. Zeng MS & Zeng YX. 2010. Pathogenesis and Etiology of Nasopharyngeal Cancer. Dalam Nasopharyngeal Cancer Multidisciplinary Management. Spinger.9-25.

12. Rusdiana, Munir D, Siregar Y. 2006. Tesis, Hubungan antibodi anti Epstein Barr Virus dengan karsinoma nasofaring pada pasien etnis Batak di Medan, FK USU, Medan.
13. Hu K, Chan AT, Costantino P, & Harrison LB. 2007. Cancer of The Nasopharyng : General Principles and Management. Dalam Site-Specific Princiles of Management of Head and Neck Cancer ; 588-617.
14. Korcum AF, Ozyar E & Ayhan A. 2006. Epstein Barr Virus genes and nasopharyngeal cancer. Turkish J. Of Cancer. Vol. 36(3).
15. Young LS, & Rickinson AB. 2004. Epstein Barr Virus : 40 Years On. Cancer Research UK Institute for Cancer Studies, University of Birmingham. Nature Reviews Cancer. Vol. 4 : 757-768.
16. Thompson MP & Kurzrock R. 2004. Epstein Barr Virus and Cancer. Clinical Cancer Research. Vol. 10 : 803-821.
17. Niedobitek G. 2000. Epstein Barr Virus infection in pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. J Clin Pathol : Mol Pathol. 53 : 248-254.
18. Yoshizaki T, Ito M, Muroso S, & Endo K. 2003. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. Kanazawa University Respiratory for Academic resources, Japan.
19. Wahyono DJ, Hermani B, & Soeharso P. 2005. Tesis. Ekspresi gen litik virus Epstein Barr : manfaatnya untuk penegakan diagnosis karsinoma nasofaring. FK UI.
20. Shan LI, Yan D, & Xue Q. 2010. Diagnostic value of Epstein Barr virus capsid antigen-IgA in nasopharyngeal carcinoma : a meta-analysis. Chinese Medical Journal;123(9):1201-1205.
21. Krishna SM, James S, & Balaram P. 2004. Serum EBV DNA as a Biomarker in Primary Nasopharyngeal Carcinoma of Indian Origin. Jpn J Clin Oncol;34(6):307-311.
22. Young LS, & Murray PG. 2003. Epstein Barr virus and oncogenesis : from latent genes to tumours. Oncogen. 22 : 5108-5121.
23. Zheng H, Li L, Hu D, Deng X, & Cao Y. 2007. Role of Epstein Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1 in the Carcinogenesis of Nasopharyngeal Carcinoma. The Chinese Society of Immunology.vol 4 (3) : 185-196.

24. Dawson CH, Port RJ, & Young LS. 2012. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Seminars in cancer biology*. 22 : 144-153.
25. Tulalamba W & Janvilisri. 2011. Nasopharyngeal Carcinoma Signaling Pathway : An Update on Molecular Biomarker. *International Journal of Cell Biology*, Vol. 2012.
26. Horikawa T, Yoshizaki T. & Furukawa. 2000. Association of Latent Membrane Protein 1 and Matrix Metalloproteinase 9 with Metastasis in Nasopharyngeal Carcinoma, *American Cancer Society*. Vol. 89.(4).
27. Punagi AQ, Mubarika S, & Yusuf I. 2013. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR Flt-4) and Latent Membrane protein 1 (LMP1) Expression in Nasopharyngeal Carcinoma. *The Open Otorhinolaryngology Journal*. Vol.7 : 10-13.
28. Bai L, & Zhu WG. 2006. P53 : Structure, Function, and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules* 2(4) : 141-153.
29. Delfitri et all. 2007. Ekspresi Protein P53 Mutan Pada Karsinoma Nasofaring. *Majalah Kedokteran Nusantara* Volume 40. No.3. September 2007.
30. Tsang NM, Kao SC, Hsien YL, Chen YP. 2001. Present of Epstein Barr virus latent membran protein 1 gene in the nasopharyngeal swab from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* ;23(3):194-200.
31. Wong KL, Leong JL, & Goh YH. 2000. Diagnostic value of Epstein Barr Viral serology in nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*;505-507.
32. Khabir A, Karray H, Rodriguez S, Rose M. 2005. EBV latent membrane protein I abundance correlates with patient age but not with metastatic behavior in North African nasopharyngeal carcinoma. *J Virol*;2:39Schattner EJ, Furman RR, & Bernal A. 2006. *NF-kB in Human Cancers*. Landes Bioscience, Springer.
33. Taweevisit M. 2007. Overexpression of p53 and neoplastic cell proliferation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *South east Asian J. Trop Med Public Health*, vol. 38;136-140.
34. Yenita, & Asri A. 2012. Korelasi antara Latent Membrane Protein 1 dengan p53 pada Karsinoma Nasofaring. *Jurnal Kesehatan Andalas*. Vol 1

35. Tabyaoui, Serhier, & Tahiri. 2013. Immunohistochemical expression of latent membrane protein 1 (LMP1) and p53 in nasopharyngeal carcinoma : Moroccan Ekspress. African Health Sciences. Vol, 13
36. Shao JY, Ernberg I, & Hu LF. 2004. Epstein Barr Virus LMP1 Status in Relation to Apoptosis, P53 Expression and Leucocyte Infiltration in Nasopharyngeal Carcinoma. Anticancer Research. 24 : 2309-2318.
37. Gulley ML & Tang W. 2008. Laboratory Assay for Epstein Barr Virus Related Disease. Journal of Molecular Diagnostic, vol.10.(4).
38. Munir D. 2006. Peran HLA pada karsinoma nasofaring. Majalah Kedokteran Nusantara vol.39 (3).
39. Tawfik O & Namiq A. 2007. Tumors of the mouth, pharynx, nose, and Paranasal Sinuses, Dalam Cancer Grading Manual. Springer : 6-12.
40. David J D, 2010. Diagnostic Immunohistochemistry. 3rd Ed . Saunders, Elsevier.
41. Renshaw S. 2006. Immunochemical Staining Techniques : Methods Express, Acion Publishing Ltd, Bioxham, UK.
42. Kumar G L et all. 2009. Education Guide : Immunohistochemical Staining Methods, Fifth Edition. Dako North America.
43. Murray PG, Young LS. 2001. Epstein Barr virus infection : Basis of malignancy and potential for therapy. Cambridge University Press:1-18
44. Jeffrey I, 2004. Epstein Barr Virus Infection, medical virology section, Massachusetts, dapat dari URL : jcohen@niaid.nih.gov.
45. Permana AD, 2008. Perbandingan Respon Tumor Primer Karsinoma Nasofaring WHO Tipe III yang disertai Ekspresi LMP-1 Dengan Yang Tanpa Ekspresi LMP-1 Terhadap Terapi Radiasi.Tesis. FK Universitas Padjajaran, Bandung.
46. Yip KW , Shi W, & Liu FF. 2006. Prognostic Significance the Epstein Barr Virus, p53, Bcl-2, and Survivin in Nasopharyngeal Cancer. Clin Cancer Res;12(19)
47. Sastroasmoro S & Ismael S. 2001. Dasar-dasar metodologi Penelitian Klinis, Sagung Seto, Edisi ke-4.

48. Altila Y. 2012. Pengaruh Radioterapi Eksterna Terhadap Nilai Ambang Eksitabilitas Nervus Fasialis Pada Terapi Radiasi Penderita Karsinoma Nasofaring, Tesis. FK Universitas Padjajaran, Bandung.
49. Katherine M. 2010. Korelasi Antara Kadar Immunoglobulin A VCA Virus Epstein Barr Serum Dengan Derajat Tumor Primer Karsinoma Nasofaring WHO Tipe III Sebelum Dan Sesudah Radioterapi, Tesis. FK Universitas Padjajaran, Bandung.
50. Hariwiyanto B.2008. Ekspresi LMP1 EBV pada keberhasilan terapi dan tiga tahun ketahanan hidup penderita karsinoma nasofaring. Laporan penelitian. Bagian Ilmu Kesehatan THT-KL, FK UGM, Yogyakarta.