

**ASOSIASI ANTARA MUTASI GEN p16 DENGAN
TIPE HISTOPATOLOGI KARSINOMA NASOFARING**



KKA
KK
PPDS.THT.03116
Sab
u.

**PENELITIAN KARYA AKHIR
UNTUK MEMPEROLEH IJAZAH KEAHLIAN
ILMU KESEHATAN TELINGA HIDUNG TENGGOROK
BEDAH KEPALA DAN LEHER**

Oleh:

Sabilarrusydi

NIM : 011080509



**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS
ILMU KESEHATAN TELINGA HIDUNG TENGGOROK
BEDAH KEPALA DAN LEHER
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
RSUD Dr. SOETOMO
SURABAYA
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

Disajikan pada tanggal

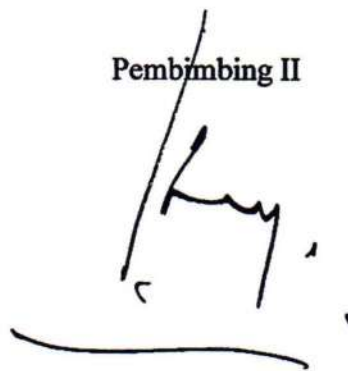
Pembimbing I



Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS

NIP. 19620831 198903 1 010

Pembimbing II



Prof. Dr. H.M.S. Wiyadi, dr., Sp.T.H.T.K.L (K)

NIP. 19420604 196712 1 001

M I B I M
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
J W R A B A Y A

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur Alhamdulillah kehadirat Allah Yang Maha Esa dengan limpahan berkat, rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menjalani pendidikan hingga selesainya karya akhir yang berjudul ‘Asosiasi antara Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring’. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh ijazah spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga – RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Dengan selesainya karya akhir ini dan berakhirnya masa pendidikan dokter spesialis, maka perkenankan saya menyampaikan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

1. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U (K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., Sp.PD, KEMD, FINASIM, Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya periode sebelumnya, yang telah memberi kesempatan untuk menempuh Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher.
2. Harsono, dr., Pelaksana Tugas Harian Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dan Dodo Anondo, dr., MPH, Direktur RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode sebelumnya, yang telah memberi ijin untuk bekerja di RSUD Dr. Soetomo

Surabaya, khususnya di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher

3. Dr. Hermanto Tri Joewono, dr., Sp.OG (K), Ketua BAKORDIK PPDS I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dan Prof. Dr. Triyono KSP, dr., Sp.Rad (K), Ketua TKP PPDS I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher.
4. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS, Ketua Departemen/ SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dan Prof. Dr. Widodo Ario Kentjono, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS, Ketua Departemen/ SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode sebelumnya, yang telah memberi kesempatan untuk menempuh Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala dan Leher.
5. Dr. A.C. Romdhoni, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS, Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya, dan Dwi Reno Pawarti, dr., Sp.T.H.T.K.L (K) Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya periode sebelumnya, yang telah memberi kesempatan untuk menempuh Pendidikan

- Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher.
6. Sekretaris Program Studi Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Haris M Ekorini, dr., Sp.T.H.T.K.L (K) yang telah memberi arahan, bimbingan dan nasehat selama menempuh Pendidikan Dokter Spesialis Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher.
 7. Dr. Nyilo Purnami, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS, Koordinator Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Departemen/ SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya, yang telah memberi bimbingan dan arahan dalam penulisan karya akhir ini.
 8. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), FICS sebagai pembimbing pertama yang dengan senang hati dan penuh kesabaran memberikan arahan, nasehat, bimbingan dan dorongan selama pendidikan spesialis sampai selesainya penulisan karya akhir ini.
 9. Prof. Dr. H.M.S. Wiyadi, dr., Sp.T.H.T.K.L (K), sebagai pembimbing kedua yang dengan senang hati dan penuh kesabaran memberikan arahan, nasehat, bimbingan dan dorongan selama pendidikan spesialis sampai selesainya penulisan karya akhir ini.
 10. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes, sebagai pembimbing statistik dan dosen Ilmu Kesehatan Masyarakat Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

yang dengan senang hati dan penuh perhatian memberikan petunjuk, saran dan masukan pada penulisan serta pengolahan data statistik penelitian ini.

11. Roestiniadi DS, dr., Sp.T.H.T.K.L, sebagai dosen wali yang dengan senang hati dan penuh kesabaran selalu memberi arahan, nasehat dan bimbingan selama proses pendidikan PPDS I di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
12. Dr. E. Bimo Aksono, drh., M.Kes sebagai Konsultan penelitian, staf di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya yang dengan senang hati dan penuh perhatian memberikan petunjuk, bimbingan, dukungan, saran dan masukan dalam penelitian ini.
13. Moh. Amin, S.Si, M.Si, Nur Syamsiatul Fajar, Amd.AM dan Virginia Ayu Ferandra, Amd.AM, staf di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu dalam pengumpulan, pengolahan dan pemeriksaan PCR dan sekuensing dalam penelitian ini.
14. Seluruh staf Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah bersedia memberikan ilmu, nasehat, dorongan dan bimbingan selama menempuh pendidikan dokter spesialis.
15. Seluruh teman sejawat PPDS I Departemen/ SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah bekerja sama dengan baik selama menempuh pendidikan dan melakukan penelitian.

16. Seluruh karyawan dan paramedis Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah banyak memberikan bantuan dan kerja sama selama menempuh pendidikan.
17. Seluruh penderita Unit Rawat Jalan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher RSUD Dr. Soetomo Surabaya yang telah dengan sukarela bersedia ikut dalam penelitian ini.
18. Rasa hormat, penghargaan dan ucapan terimakasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua tercinta ayah Mochammad Akib dan ibu Elik Azizah yang telah membesarkan, mendidik, melimpahkan doa, dukungan moril dan materi tak pernah putus, sumber kekuatan, penanam rasa tanggung jawab dan motivasi untuk terus belajar dan menyelesaikan pendidikan ini.
19. Bapak mertua Drs. H. Achmad Miftach, SH, MH dan Ibu mertua Hj. Bariroh, BA yang telah melengkapi hidup, memberikan doa, dukungan, sumber inspirasi, pembawa cahaya, nasehat dan motivasi untuk terus belajar hingga dapat menyelesaikan pendidikan ini.
20. Kepada saudara tercinta Uwais Alqarni, SE, Khuluqul Karimah, S.AB, Salman Farisi, SE dan Abid Kharisma, A.Md terimakasih atas segala pengertian, dorongan semangat, dukungan moril dan bantuan langsung maupun tidak langsung sebelum dan selama menjalani pendidikan spesialis ini.
21. Istri tersayang, Naely Rahma, dr., Sp.Rad yang penuh kesetiaan, kesabaran, kekuatan, sumber ketenangan, perhatian, bantuan doa, bantuan materi dan maaf yang luar biasa dengan memberikan dorongan dan pembangkit semangat

untuk meneruskan pendidikan ini sampai selesai. Buah hati tersayang, Aisyah Ismata Sarah dan Sumayya Alifa Sarah yang menjadi permata hati dan cahaya semangat selama menempuh pendidikan ini.

22. Teman satu angkatan selama PPDS I. Terima kasih atas segala persaudaraan, kebersamaan, bantuan dan pengalaman tak terlupakan yang telah dilalui bersama selama pendidikan ini, semoga tali persaudaraan ini tidak akan pernah terputus.
23. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu selama menempuh pendidikan maupun dalam pelaksanaan penelitian serta penulisan karya akhir ini.

Akhirnya pada kesempatan ini penulis menyampaikan permintaan maaf yang setulus-tulusnya kepada semua guru, teman sejawat, paramedis serta karyawan di lingkungan Departemen/ SMF Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok - Bedah Kepala dan Leher Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya atas semua kesalahan dan kekhilafan selama menempuh pendidikan dokter spesialis.

Semoga Allah Yang Maha Pengasih dan Penyayang senantiasa melimpahkan hidayah, ampunan dan rahmat-Nya. Amin.

Surabaya, Maret 2016

Penulis

RINGKASAN

ASOSIASI ANTARA MUTASI GEN p16 DENGAN TIPE HISTOPATOLOGI
KARSINOMA NASOFARING

Sabilarrusydi

Karsinoma nasofaring (KNF) merupakan penyakit keganasan yang berasal dari sel epitel nasofaring. Tipe histopatologi KNF diketahui mempunyai asosiasi dengan respons terapi dan prognosis. Derajat diferensiasi sel mencerminkan tingkat proliferasi. Semakin baik derajat diferensiasi maka tingkat proliferasi sel semakin rendah. Pertumbuhan tumor dan metastasis akibat proliferasi tak terkendali pada penderita KNF diduga oleh karena peran gen p16. Inaktivasi gen p16 menurunkan ekspresi protein p16 bahkan tidak ada sehingga terjadi penurunan regulasi siklus sel. Beberapa penelitian menyatakan mutasi gen p16 dapat digunakan sebagai salah satu indikator prognosis dan strategi pemberian terapi lebih baik pada KNF.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi pada penderita KNF.

Penelitian dilakukan di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya mulai bulan Oktober 2015 hingga Februari 2016. Jenis penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan rancangan *cross sectional*. Sampel diambil secara *consecutive sampling*. Bahan biopsi dibagi 2 bagian untuk pemeriksaan histopatologi dan PCR. Pembacaan tipe histopatologi dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo oleh konsultan patologi. Mutasi gen p16 diperiksa dari jaringan tumor primer KNF dengan PCR menggunakan mesin *GeneTouch* Bioneer dan sekuensing DNA menggunakan mesin ABI PRISM 310 di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga kemudian dinilai oleh staf konsultan LPT UNAIR. Dilakukan uji statistik menggunakan uji *Spearman* untuk menentukan asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF (WHO tipe 1, 2, 3).

Penelitian mendapatkan 21 penderita KNF yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Hasil penelitian mendapatkan bahwa mutasi gen p16 negatif pada 19 (90,48%) sampel, dan mutasi positif sebanyak 2 (9,52%) sampel. Semua sampel dengan mutasi p16 positif merupakan KNF dengan histopatologi WHO tipe 3. Hasil uji *Spearman* mendapatkan nilai $p = 0,568$ dan $r = -0,132$. Asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi (WHO tipe 1, 2, 3) pada penderita KNF didapatkan hasil yang tidak bermakna ($p > 0,05$).

Kesimpulan penelitian ini tidak terdapat asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF.



SUMMARY

THE ASSOCIATION BETWEEN MUTATION OF P16 GENE AND HISTOPATHOLOGICAL TYPE OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Sabilarrusydi

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a malignancy derived from nasopharyngeal epithelial cells. Histopathological type known associated with therapy response and prognosis. Degree of differentiation of tumor sel associated with proliferation level. More better degree of differentiation mean more low of the proliferation level. Tumor growth and metastasis in NPC patients cause of uncontrolled cell proliferation suspected role of gen p16. Inactivation p16 gene cause down regulation expression of p16 protein that could been uncontrolled cell cyclus in NPC. Previous researches states that mutation of p16 gene could be a prognosis predictor and able to prepare better therapy of NPC.

The purpose of this study is to determine association mutation of p16 gene of NPC patients with histopathological type.

The study was conducted at OPD ORL-HNS outpatient Department of Dr. Soetomo hospital Surabaya, from October 2015 to February 2016. The study was analytic observational with cross sectional design. Samples were collected by consecutive sampling. Biopsy specimens were divided into two part for pathology and PCR examination. Pathology examination was performed in Pathology Anatomy Instalation at Dr. Soetomo general hospital Surabaya and assessed by pathologist consultant. The mutation of p16 gene was obtained through PCR with GeneTouch machine and sequencing examination in NPC primary tissue examined with ABI PRISM 310 machine and analyze by staff consultant in Institute of Tropical Disease University Airlangga. The statistic *Spearman test* was used to determine the association between mutation of p16 gene with histopathological WHO type 1, 2 and 3 of NPC.

There were 21 patients NPC patients that met the inclusion and exclusion criteria. Showed negative mutation of p16 gene were 19 (90.48%) samples, and 2 (9.52%) samples with positive mutation of p16 gene which all mutation were WHO type 3. Spearman test results was scores $p = 0.568$ with a correlation coefficient -0.132 . Association mutation of p16 gene with histopathological type (WHO type 1, 2, 3) in patients with NPC showed not significant ($p > 0.05$).

The study concluded that there was not association between mutation of p16 gene and histopathological type of NPC.



ABSTRACT

THE ASSOCIATION BETWEEN MUTATION OF p16 GENE AND HISTOPATHOLOGICAL TYPE OF NASOPHARYNGEAL CARCINOMA

Sabilarrusydi

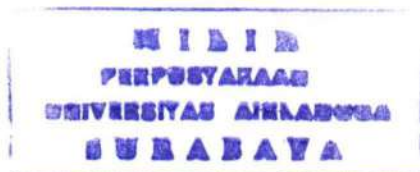
Objective : Tumor growth and metastasis in NPC patients suspected role of several molecular biomarkers that have been identified in tumor specimens of patients with NPC. Recent research states p16 gene inactivated cause of mutation can be a indicator of prognosis and able to prepare better therapy for NPC. The purpose of this study is to analyze mutation of p16 gene of NPC patients which associate with histopathological type of NPC.

Methods : Biopsy specimens divided into two part, first part for pathology examination and second part for PCR. Histopathological type were obtained from 21 NPCs with Meyer,s hematoxillin eosin staining divided into three type, WHO type 1, type 2 and type 3. Assesment of histopathological type was performed by pathologist consultant. The mutation of p16 gene was obtained with polymerase chain reaction from primary tumor tissue with termal cycler machine Bioneer and sequencing with ABI PRISM 310 machine. Assessment of mutation was performed by consultant staff from Institute of Tropical Disease Airlangga university Surabaya. The Spearman's test was used to determine the relationship between mutation of p16 gene and histopatological type of NPC. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Result : There were 21 NPC patients that met the inclusion and exclusion criteria. Showed negative mutation of p16 gene by 19 (90.48%) for all samples, and 2 (9.52%) with positive mutation of p16 gene which all mutation were WHO type 3. Spearman test results scores $p = 0.568$ with a correlation coefficient -0.132. Association mutation of p16 gene with histopathological type (WHO type 1, 2, 3) in patients with NPC showed not significant ($p > 0.05$).

Conclusion : There was not association between mutation of p16 gene and histopathological type of nasopharyngeal carcinoma.

Keywords : Nasopharyngeal carcinoma, mutation of p16 gene, histopathological type.



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iv
RINGKASAN.....	x
SUMMARY.....	xi
ABSTRACT.....	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat teoritis	4
1.4.2 Manfaat praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Karsinoma Nasofaring	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Perubahan genetik dan epigenetik.....	6
2.1.3 Epidemiologi	15
2.1.4 Etiologi.....	16
2.1.5 Histopatologi.....	18
2.1.6 Diagnosis.....	21
2.1.7 Klasifikasi stadium.....	27
2.1.8 Terapi.....	28
2.2 Gen p16.....	31
2.2.1 Struktur	31
2.2.2 Fungsi.....	33
2.2.3 Pemeriksaan gen p16.....	36
2.2.4 Mutasi gen p16 dan dampaknya.....	38
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..	46
3.1 Kerangka Konseptual	46
3.2 Hipotesis Penelitian	47
BAB 4 METODE PENELITIAN	48
4.1 Jenis Penelitian	48
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	48
4.3 Bahan Penelitian.....	48

4.3.1 Populasi	48
4.3.2 Sampel	49
4.3.3 Besar sampel	49
4.3.4 Teknik pengambilan sampel	50
4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional	50
4.4.1 Variabel penelitian	50
4.4.2 Definisi operasional.....	50
4.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian	52
4.6 Kerangka Operasional Penelitian.....	53
4.7 Pengolahan dan Analisis Data.....	54
4.8 Jadwal Penelitian.....	54
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	55
5.1 Data Dasar.....	55
5.2 Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi KNF.....	58
5.3 Hasil Analisis Statistik Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi KNF.....	60
BAB 6 PEMBAHASAN.....	61
6.1 Data Dasar.....	63
6.2 Mutasi gen p16 pada KNF.....	67
6.3 Asosiasi Mutasi gen p16 dengan Tipe Histopatologi KNF.....	69
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	74
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	76
7.1 Kesimpulan.....	76
7.2 Saran.....	76
DAFTAR PUSTAKA.....	77
LAMPIRAN.....	85

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Penilaian T, N, dan M pada KNF.....	27
Tabel 2.2	Kelompok stadium KNF menurut NCCN tahun 2011.....	28
Tabel 2.3	Urutan oligonukleotida tiap ekson gen p16.....	33
Tabel 4.1	Urutan oligonukleotida tiap ekson gen p16.....	51
Tabel 4.2	Tipe histopatologi KNF berdasar WHO tahun 1991.....	52
Tabel 4.3	Jadwal penelitian	54
Tabel 5.1	Distribusi data.....	55
Tabel 5.2	Distribusi jenis kelamin.....	56
Tabel 5.3	Distribusi suku bangsa.....	56
Tabel 5.4	Distribusi jenis pekerjaan.....	57
Tabel 5.5	Distribusi klasifikasi stadium.....	57
Tabel 5.6	Distribusi tipe histopatologi.....	57
Tabel 5.7	Distribusi pemeriksaan PCR.....	59
Tabel 5.8	Hasil pemeriksaan mutasi gen p16 pada berbagai tipe histopatologi.....	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Profil kelainan hipermetilasi DNA pada sel kanker.....	10
Gambar 2.2	Reaksi metilasi yang dikatalisasi oleh DNMT.....	11
Gambar 2.3	Perbaikan DNA dengan cara eksisi basa.....	12
Gambar 2.4	Perbaikan DNA dengan cara eksisi nukleotida	13
Gambar 2.5	Perbaikan DNA salah pasang rantai induk dan anak dengan cara eksisi rangkaian nukleotida.....	14
Gambar 2.6	Perbaikan DNA melalui proses demetilasi	15
Gambar 2.7	Histopatologi KNF WHO tipe 1.....	19
Gambar 2.8	Histopatologi KNF WHO tipe 2.....	20
Gambar 2.9	Histopatologi KNF WHO tipe 3.....	21
Gambar 2.10	Pencitraan CT <i>scan</i> dan MRI KNF.....	25
Gambar 2.11	Struktur gen p16.....	32
Gambar 2.12	Fungsi gen p16.....	34
Gambar 2.13	Peran gen p16.....	35
Gambar 2.14	Hasil PCR jaringan normal (N) dan tumor (T) lokus mutasi INK4a/ARF pada keganasan sel skuamosa.....	37
Gambar 2.15	Grafik hasil sekuensing gen p16.....	38
Gambar 2.16	Bentuk mutasi gen p16.....	39
Gambar 2.17	Mutasi <i>missense</i>	40
Gambar 2.18	Mutasi <i>nonsense</i>	41
Gambar 2.19	Mutasi insersi	41
Gambar 2.20	Mutasi delesi.....	42
Gambar 2.21	Mutasi duplikasi	43
Gambar 2.22	Mutasi <i>frameshift</i>	43
Gambar 2.23	Mutasi ekspansi pengulangan	44
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian.....	46
Gambar 4.1	Kerangka operasional penelitian	53
Gambar 5.1	Pemeriksaan PCR pada jaringan tumor.....	58
Gambar 5.2	Sekuensing sampel jaringan KNF.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keterangan kelaikan etik.....	85
Lampiran 2	Penjelasan penelitian untuk disetujui.....	86
Lampiran 3	Lembar persetujuan mengikuti penelitian.....	88
Lampiran 4	Lembar persetujuan tindakan medis.....	89
Lampiran 5	Lembar pengunduran diri.....	90
Lampiran 6	Lembar pengumpul data.....	91
Lampiran 7	Teknik pengecatan hematoksilin eosin cara Meyer.....	92
Lampiran 8	Pemeriksaan mutasi gen p16 dengan teknik PCR.....	93
Lampiran 9	<i>Dummy table</i>	96
Lampiran 10	Hasil analisis statistik.....	97
Lampiran 11	Rekapitulasi data penelitian.....	100

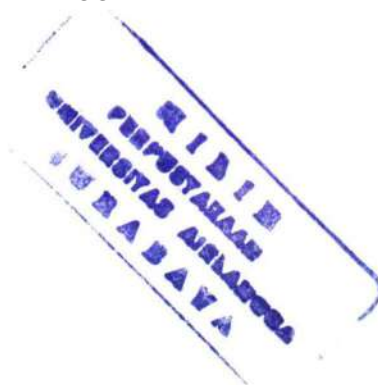


DAFTAR SINGKATAN

AKT	: <i>AKT8 virus oncogene cellular homolog</i>
AP-1	: <i>Activator protein-1</i>
ARF	: <i>Alternative reading frame</i>
Bcl-2	: <i>B-cell lymphoma-2</i>
CDK	: <i>Cyclin dependent kinase</i>
CDKN2A	: <i>Cyclin dependent kinase 2A</i>
CD8 ⁺	: <i>Cluster of differentiation 8⁺</i>
c-Myc	: <i>Cellular myelocytomatosis</i>
COX-2	: <i>Cyclo-oxygenase-2</i>
CREB	: <i>cAMP-response element binding protein</i>
DAPK	: <i>Death-associated protein kinase</i>
DCRT	: <i>Dimentional conformal radiotherapy</i>
DLC1	: <i>Deleted in liver cancer 1</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT	: <i>DNA methyltransferase enzymes</i>
EA	: <i>Early antigen</i>
EBV	: <i>Epstein Barr virus</i>
ELISA	: <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	: <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
Ets2	: <i>Erythroblastosis oncogene homolog 2</i>
E2F	: <i>Expanding family of heterodimeric 2 transcription factors</i>
Fase G1	: <i>Growth phase-1</i>
Fase G2	: <i>Growth phase-2</i>
Fase M	: <i>Mitotic phase</i>
Fase S	: <i>Synthetic phase</i>
GWA	: <i>Genome wide association</i>
HDM	: <i>Human double minute</i>
HLA	: <i>Human leucocyte antigen</i>
HPV	: <i>Human papilloma virus</i>
IGRT	: <i>Image guided radiation therapy</i>
INK4a	: <i>Inhibitor CDK4</i>
IMRT	: <i>Intensity modulated radiotherapy</i>
KGB	: <i>Kelenjar getah bening</i>
KNF	: <i>Karsinoma nasofaring</i>

LD	: <i>Linkage disequilibrium</i>
LMP1	: <i>Latent membrane protein 1</i>
LPT	: Lembaga Penyakit Tropik
MAP	: <i>Mitogen-activated protein</i>
MBD	: <i>Methyl CpG binding domain</i>
MeCP	: <i>Methyl CpG binding proteins</i>
MGMT	: <i>O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MHC	: <i>Major histocompatibility complex</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
mRNA	: <i>massanger ribonucleic acid</i>
MTHFR	: <i>Methylenetetrahydrofolate reductase</i>
NCCN	: <i>National comprehensive cancer network</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor-κB</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositol 3-kinases</i>
p16	: Protein 16
POSA	: Poli Onkologi Satu Atap
PPDS	: Program Pendidikan Dokter Spesialis
RASSF1A	: <i>Ras associaion domain family member 1A</i>
Rb	: Retinoblastoma
RSUD	: Rumah Sakit Umum Daerah
RSUP	: Rumah Sakit Umum Pusat
SSCP	: <i>Single-stranded conformation polymorphism</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
THT-KL	: Telinga Hidung Tenggorok Kepala dan Leher
TNM	: Tumor primer, nodul koli, metastasis jauh
TSG	: <i>Tumor suppressor genes</i>
URJ	: Unit Rawat Jalan
USG	: Ultrasonografi
VEGF	: <i>Vascular endothelial cell growth factor</i>
VCA	: <i>Viral capsid antigen</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB I
PENDAHULUAN



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Karsinoma nasofaring (KNF) masih sering menyebabkan kekambuhan meskipun sudah mendapatkan terapi lengkap baik dengan radioterapi, kemoterapi atau kombinasi keduanya. Penderita KNF yang mempunyai respons lengkap pasca terapi masih rendah. Selama ini, tipe histopatologi KNF *World Health Organization* (WHO) tipe 2 dan 3 diketahui mempunyai respons terapi lebih baik dibanding tipe 1 namun fakta mendapatkan bahwa penderita KNF WHO tipe 2 dan 3 mempunyai respons terapi seperti tipe 1 (Lee, *et al.*, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa tipe histopatologi kurang akurat mencerminkan respons terapi KNF sehingga diperlukan suatu indikator yang dapat menjelaskan prediksi respons terapi dengan lebih akurat (Mäkitie, *et al.*, 2003).

Derajat diferensiasi sel mencerminkan tingkat proliferasi sel, semakin baik derajat diferensiasi maka tingkat proliferasinya semakin rendah (Osman, *et al.*, 2012). Gen p16 berperan penting dalam siklus sel dan mempunyai pengaruh terhadap proliferasi sel melalui produk gen yaitu protein p16. Mutasi gen p16 mengakibatkan inaktivasi gen sehingga p16 menurun atau tidak didapatkan (Agarwal, *et al.*, 2012). Beberapa penelitian mengenai hubungan mutasi gen p16 dan tipe histopatologi telah dilakukan. Penelitian Xiang dan Zhang (2005) melaporkan bahwa 10 (43,4%) dari 23 penderita KNF *non keratinizing squamous cell* mengalami mutasi sedangkan 2 (8,7%) penderita terjadi hipermetilasi. Penelitian lain di Kanada menunjukkan

penurunan atau tidak didapatkannya p16 pada KNF akibat inaktivasi gen p16 antara grup *keratinizing* dengan grup *non keratinizing squamous cell* hampir sama (Mäkitie, *et al.*, 2003). Sampai saat ini belum diketahui asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi penderita KNF yang berobat di Unit Rawat Jalan (URJ) RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

Penelitian gen p16 dengan sampel 3 *cell line*, 3 *xenograft* dan 45 tumor primer KNF mendapatkan mutasi gen p16 pada ketiga sampel *cell line*, namun tidak didapatkan mutasi pada *xenograft* maupun tumor primer. Semua mutasi terjadi di ekson 2 dan berakibat inaktivasi gen (Lo, Huang & Lau, 1995). Penelitian Ko, *et al.*, (2002) mendapatkan mutasi gen p16 pada 3 *cell line* KNF di ekson 2 dan berakibat inaktivasi gen, namun tidak mendapatkan mutasi pada 30 sampel tumor primer dan 18 jaringan nasofaring KNF rekuren. Penelitian lain menunjukkan bahwa inaktivasi gen p16 menyebabkan penurunan atau tidak didapatnya p16 pada KNF grup WHO tipe 2 dan 3 sebesar 42 (59%) dari 71 penderita serta tipe 1 sebesar 7 (54%) dari 13 penderita (Mäkitie, *et al.*, 2003).

Mutasi gen p16 dapat disebabkan oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal berupa mutasi spontan yang terjadi saat proses replikasi yaitu pada fase mitosis dan meiosis. Faktor eksternal yang dapat menyebabkan mutasi adalah rokok, radiasi ion dan sinar ultra violet. Mutasi gen p16 menyebabkan perubahan basa nukleotida dan bentuk *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang mengakibatkan kesalahan replikasi dan transkripsi (Loewe, 2008). Hal tersebut menyebabkan inaktivasi gen yang mengakibatkan produksi p16 menurun bahkan tidak ada.

Penurunan atau tidak didapatnya protein p16 akan meningkatkan *cyclin* D1 di sitoplasma sel. Selain p16, protein lain yang dapat mempengaruhi *cyclin* D1 adalah p15, p18 dan p19. Peningkatan *cyclin* D1 mengakibatkan hambatan fosforilasi protein retinoblastoma (pRb) berakibat *expanding family of heterodimeric 2 transcription factors* (E2F) tidak terlepas dari pRb, sehingga terjadi peningkatan ikatan pRb-E2F yang berakibat peningkatan sel KNF dalam fase sintesis (S). Faktor lain yaitu peningkatan *cellular myelocytomatosis* (c-Myc) dan penurunan deltaNp63 dapat meningkatkan sel KNF pada fase S. Sel KNF lebih bersifat imortal sehingga proliferasi sel menjadi tak terkendali (Hu, 2010).

Karsinoma nasofaring WHO tipe 2 dan 3 mempunyai karakteristik tidak berkeratin dengan derajat diferensiasi sel lebih jelek dibanding tipe 1 sehingga lebih radiosensitif dan kemosensitif (Fosbinder, 2011). Sensitifitas terhadap radiasi dan kemoterapi juga dipengaruhi fase sel. Sel KNF menunjukkan sensitifitas tinggi terhadap kemoradiasi saat fase mitosis (M) dan *growth* (G) 2, kurang sensitif pada fase G1 serta paling resisten di fase *late* S (Baumann, Krause & Hill, 2008).

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi pada penderita KNF yang berobat di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF (WHO tipe 1, 2, 3) ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Membuktikan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menilai ada atau tidaknya mutasi gen p16 pada KNF dengan histopatologi WHO tipe 1, 2 dan 3.
2. Menganalisis asosiasi mutasi gen p16 dengan berbagai tipe histopatologi KNF (WHO tipe 1, 2 dan 3).

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Memberikan informasi ilmiah mengenai asosiasi mutasi gen p16 dalam peranannya sebagai pemicu sifat imortalitas dan proliferasi sel tak terkendali terhadap berbagai tipe histopatologi KNF (WHO tipe 1, 2, 3).

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini dapat dipergunakan sebagai bahan pertimbangan untuk menilai prediksi respons terapi KNF.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karsinoma Nasofaring

2.1.1 Definisi

Karsinoma nasofaring adalah keganasan yang berasal dari epitel mukosa yang melapisi permukaan nasofaring, sering berasal dari daerah resesus nasofaring lateral atau fosa Rosenmüller (Hwang, *et al.*, 2002; Du, 2012). Karsinoma nasofaring mempunyai karakteristik berbeda dengan karsinoma sel skuamosa daerah kepala dan leher yang lain. Sifat khas KNF adalah distribusi regional yang jelas dan perbedaan prevalensi rasial (Tulalamba & Janvilisri, 2012). Keganasan ini dilaporkan pertama kali tahun 1901 dan dijelaskan karakteristiknya secara klinik tahun 1922 (Zeng & Zeng, 2010).

Nasofaring adalah ruang yang terletak di belakang hidung dan sisi atas dari palatum mole. Ruang ini tersembunyi dan kurang sensitif terhadap nyeri, namun banyak kelenjar getah bening (KGB) atau jaringan limfoepitelial. Karakteristik tersebut mengakibatkan KNF sulit dideteksi dini, mudah terjadi penyebaran regional dan terlambat untuk mendapatkan terapi (Tulalamba & Janvilisri, 2012). Karsinoma nasofaring dapat ditemukan pada masa anak dengan klinis tersering berupa benjolan leher (Vianna, *et al.*, 2012). Karsinoma ini sebagian besar radiosensitif namun angka kelangsungan hidup 5 tahun sekitar 65% karena sering ditemukan dalam kondisi stadium lanjut (Lee, *et al.*, 2003).

2.1.2 Perubahan genetik dan epigenetik

a. Perubahan genetik

Perubahan genetik pada penderita KNF terjadi akibat kelainan kromosom atau kerentanan genetik terhadap infeksi EBV. Kelainan kromosom dapat berupa mutasi poin, delesi dan duplikasi. Di Tiongkok, kromosom yang sering mengalami duplikasi pada penderita KNF antara lain 1q, 3q, 8q, 12p dan 12q, sedangkan kromosom 1p, 3p, 9p, 9q, 11q, 13q, 14q dan 16q sering mengalami delesi (Lo, Chung & To, 2013). Kromosom yang diketahui konsisten mengalami duplikasi yaitu kromosom 12 sedangkan kromosom 3p, 9p dan 14q sering ditemukan mengalami delesi yang mencapai sekitar lebih dari 85% dari seluruh tumor primer (Cho, 2007; Du, 2012). Duplikasi pada kromosom 12 dan delesi alel kromosom 11q, 13q dan 16q dilaporkan meningkatkan sifat invasif tumor (Chan, Teo & Johnson, 2002).

Delesi alel pada lengan pendek kromosom 3 dan 9 berhubungan dengan inaktivasi beberapa *tumor suppressor genes* (TSG) meliputi gen *Ras association domain family member* (RASSF) 1A, *death-associated protein kinase* (DAPK) 1, p14, p15, p16, p53 dan p63 (Lo, Chung & To, 2013). Selain delesi, beberapa gen tersebut dapat juga mengalami mutasi poin walupun sangat jarang. Infeksi laten EBV dapat memicu inaktivasi TSG (akibat delesi atau mutasi) menyebabkan sel epitel nasofaring mengalami perkembangan displasia berat hingga menjadi karsinoma karena terganggunya kontrol siklus sel dan apoptosis (Tsang, *et al.*, 2014).

Gen *human leucocyte antigen* (HLA) mempunyai hubungan yang kuat dengan perkembangan KNF. Gen ini sangat polimorfik dan menyandi molekul HLA yang mempunyai fungsi utama mempresentasikan antigen asing pada sistem imun

termasuk peptida virus. Molekul HLA kelas I (HLA-A, HLA-B dan HLA-C) dihasilkan oleh semua sel berinti dan berfungsi mempresentasikan antigen asing pada sel T CD8⁺ sehingga mampu mengenali dan melisis sel yang terinfeksi. Molekul HLA kelas II (HLA-DR, HLA-DQ dan HLA-DP) dihasilkan oleh suatu populasi sel sistem imun yang terbatas, terutama sel limfosit B, mempresentasikan antigen asing pada sel T *helper* serta terlibat dalam peningkatan antibodi dan respon imun sel T sitotoksik (Hildesheim, *et al.*, 2002; Su, Hildesheim & Chang, 2013).

Sebagian besar KNF adalah EBV positif, sehingga individu yang mewarisi alel HLA yang mengalami penurunan kemampuan mempresentasikan antigen EBV pada sistem imun mempunyai risiko tinggi menderita KNF (Hildesheim, *et al.*, 2002; Munir, 2006). Variasi HLA berperan penting sebagai indikator etiologi atau prognosis pada KNF. Peningkatan risiko menderita KNF didapatkan pada individu dengan alel HLA-A2, HLA-B17 dan HLA-Bw46. Besarnya risiko menderita KNF tergantung pada variasi ekspresi ketiga HLA tersebut yaitu dapat muncul sendiri atau bersama-sama sehingga menimbulkan variasi prognosis. Alel HLA-B17 berasosiasi dengan prognosis buruk, sedangkan HLA-A2 berprognosis baik (Thompson, 2007).

Studi *genomewide association* (GWA) menunjukkan gen HLA terdapat didalam *major histocompatibility complex* (MHC) kromosom 6p21.3 menghasilkan peningkatan risiko kejadian KNF (Simons, 2010). Gen HLA kelas I memiliki hubungan kuat dan konsisten terhadap kejadian KNF (Tang, *et al.*, 2012). Virus Epstein Barr merupakan satu-satunya yang sudah diketahui dapat hidup lama secara laten dalam limfosit B. Virus ini dapat menginfeksi kembali kompartemen epitel saat reaktivasi litik untuk proses pembentukan dan transmisi virus. Gen HLA kelas I

diduga sebagai mediator penting dalam kompleks biologis siklus kehidupan EBV (Su, Hildesheim & Chang, 2013).

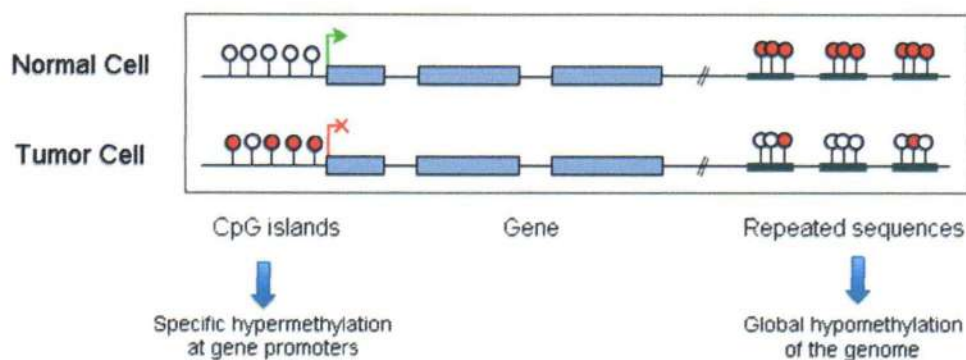
Regio MHC memiliki banyak gen (>200 gen) dan sering terdapat pola *linkage disequilibrium* (LD). Pola LD dikendalikan oleh gen HLA atau non HLA yang juga ikut terlibat. Studi GWA melaporkan HLA kelas I berperan penting dalam hubungan antara EBV dengan kanker, sedangkan HLA kelas II berperan dalam hubungan antara *human papilloma virus* (HPV), *hepatitis B virus* (HBV) dan *hepatitis C virus* (HCV) (Su, Hildesheim & Chang, 2013). Gen HLA kelas I penyebab KNF juga didapatkan pada kromosom 4p15.1-q12, 3p21.31-21.2, dan kromosom 9. Beberapa penelitian melaporkan keterlibatan HLA kelas II dalam kejadian KNF melalui HLA-DR, DQ dan DP (Simons, 2012). Penelitian di Indonesia, HLA-A, HLA-B, HLA-DR dan HLA-DQ berperan dalam kejadian KNF pada kromosom 6 (Munir, 2011).

b. Perubahan epigenetik

Perubahan epigenetik merupakan suatu perubahan yang diturunkan pada ekspresi gen namun tidak dikodekan pada rangkaian DNA. Bentuk perubahan epigenetik yang terjadi pada sel manusia berupa metilasi DNA dan deasetilasi histon (Zhang, *et al.*, 2012). Karsinoma nasofaring merupakan keganasan yang banyak ditemukan perubahan epigenetik. Penelitian melaporkan perubahan epigenetik pada TSG, gen adesi dan gen apoptosis mempunyai peranan besar dalam perkembangan KNF (Bhatt, *et al.*, 2010). Gen tersebut meliputi gen RASSF1A, RASSF2A, p14, p16, *cell adhesion molecules* (CADM) 1, *deleted in liver cancer* (DLC) 1 dan *H-cadherin* (CDH13). Perubahan epigenetik yang tersering berupa hipermetilasi sehingga menyebabkan inaktivasi gen (Hutajulu, *et al.*, 2011).

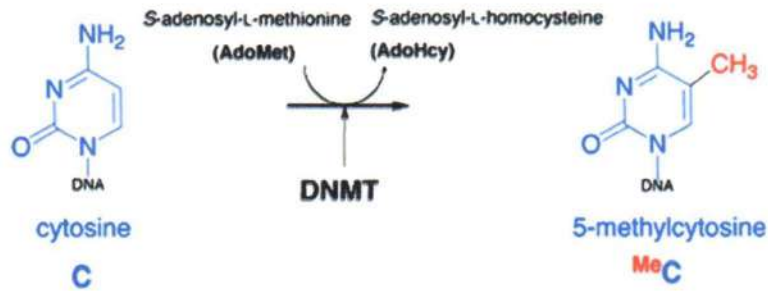
Gen p16 merupakan salah satu TSG yang dapat mengalami perubahan genetik dan epigenetik pada KNF. Perubahan genetik berupa mutasi poin dan delesi kromosom, sedangkan perubahan epigenetik berupa hipermetilasi. Hipermetilasi gen p16 pada KNF lebih sering terjadi dibandingkan delesi kromosom dan mutasi poin. Infeksi EBV melalui LMP1 mempunyai peranan dalam hipermetilasi gen p16 dengan cara memicu pembentukan c-Jun/JunB heterodimer sehingga DNA metiltransferase teraktivasi (Chou, *et al.*, 2008). Hipermetilasi terjadi pada gen *promoter* yang mengenai CpG *dinucleotide*, terletak di CpG *islands*, yaitu posisi 5 sitosin menuju ke guanin pada rantai ganda DNA (Moison, Peugeot & Arimondo, 2013). Hipermetilasi pada beberapa gen termasuk gen p16 mengakibatkan penurunan apoptosis pada sel kanker (Hervouet, *et al.*, 2013).

Pada KNF, perubahan epigenetik suatu gen dapat merubah pola ekspresi yang berakibat inaktivasi gen tersebut beserta produk fungsionalnya. Perubahan epigenetik dapat terjadi secara langsung melalui metilasi DNA pada gen atau secara tidak langsung melalui metilasi, asetilasi, atau fosforilasi histon dan protein lain sekitarnya yang berakibat terbentuknya kromatin cacat (Cho, 2007). Hipermetilasi dan perubahan genetik memiliki peran penting dalam tumorigenesis. Lokal hipermetilasi seperti pada gen *promoter* mengakibatkan hipometilasi DNA secara global sehingga memicu transkripsi sekuen DNA cacat dan reekspresi gen *promoter* (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Profil kelainan hipermetilasi DNA pada sel kanker. Hipermetilasi DNA pada lokasi CpG *islands* gen *promoter* memicu hipometilasi global genom. Warna merah menunjukkan metilasi (Moison, Peugeot & Arimondo, 2013).

Reaksi metilasi dikatalisasi oleh DNA *methyltransferase enzymes* (DNMT) menggunakan *S-adenosyl-L-methionine* mendonorkan metil membentuk 5-*methylcytosine*. Enzim DNMT berperan dalam pengaturan metilasi suatu gen terbagi dalam DNMT1, 2 dan 3. Enzim DNMT1 menjaga pola metilasi DNA saat terjadi pembelahan sel dengan menduplikasi pola metilasi DNA pada rantai sintesis baru sel somatik terutama pada fase S. Enzim DNMT3 berperan pada proses metilasi DNA selama perkembangan embrionik mulai dari implantasi hingga gametogenesis. Peningkatan enzim ini memicu hipermetilasi (Das & Singal, 2004). Proses metilasi nukleotida pada rangkaian DNA dapat dilihat pada Gambar 2.2.

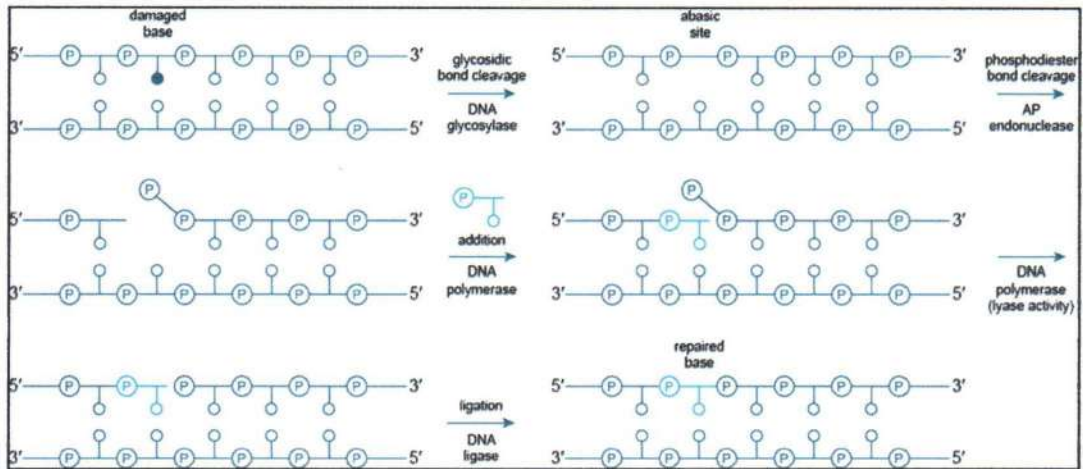


Gambar 2.2 Reaksi metilasi yang dikatalisasi oleh DNMT (Moison, Peugeot & Arimondo, 2013).

Perbaikan rangkaian DNA dari suatu gen yang mengalami mutasi dapat melalui beberapa mekanisme meliputi perbaikan spontan, eksisi basa DNA, eksisi nukleotida, perbaikan salah pasangan dan cara lain. Perbaikan spontan melalui demetilasi terutama pada mutagenik yang tinggi dan terdapat lesi DNA sitotoksik dengan enzim *O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase* (MGMT). Eksisi basa DNA dengan enzim DNA glikosilase. Eksisi nukleotida menggunakan enzim endonuklease, DNA polimerase dan DNA ligase. Perbaikan salah pasangan (rantai induk dan anak) dengan metilasi DNA. Cara lain melalui non homolog (dengan DNA ligase) atau rekombinasi homolog (Brown, 2012). Perbaikan rangkaian DNA dapat berupa:

a. Eksisi basa

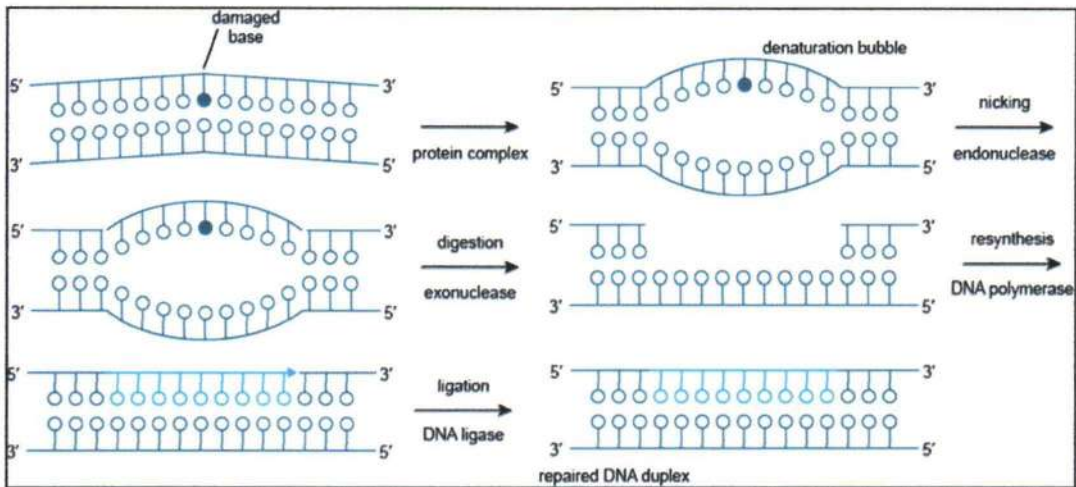
Basa rantai DNA yang rusak dihilangkan dengan cara memutus rantai DNA, dilakukan penggantian basa DNA baru kemudian dilakukan penyambungan kembali rantai DNA. Enzim yang berperan meliputi DNA glikosilase, AP endonuklease, DNA polimerase dan DNA ligase (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Perbaikan DNA dengan cara eksisi basa DNA. Rantai DNA yang mengalami kerusakan basa dilakukan penghilangan basa rusak oleh enzim DNA glikosilase, pemotongan rantai oleh AP endonuklease, penggantian dan perbaikan basa yang sesuai oleh DNA polimerase serta penyambungan rantai dengan DNA ligase (Brown, 2012).

b. Eksisi rangkaian nukleotida

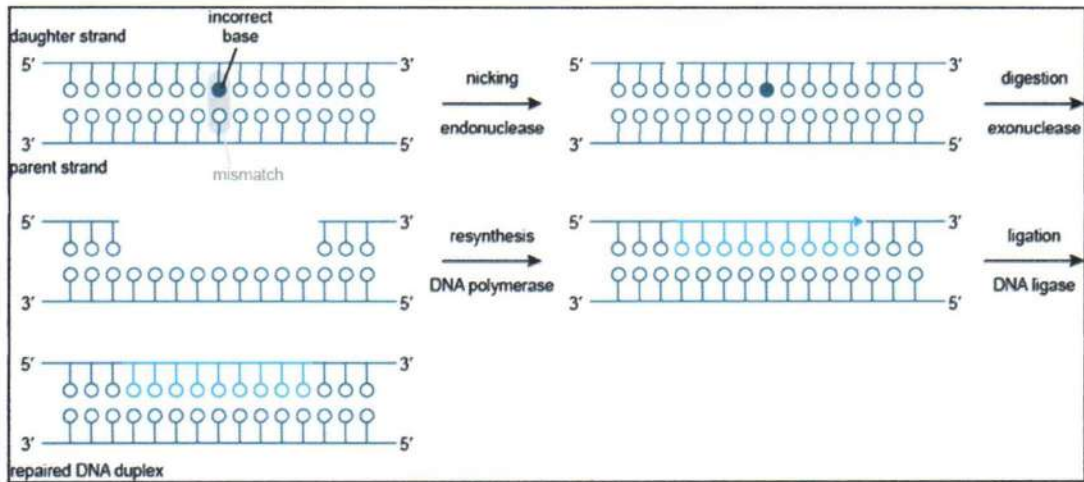
Basa yang rusak diperbaiki dengan cara mengganti rangkaian nukleotida. Perbaikan diawali dengan pembentukan bula denaturasi oleh enzim endonuklease kemudian rangkaian nukleotida dipotong oleh eksonuklease. Sintesis rangkaian nukleotida baru menggunakan enzim DNA polimerase dan disambungkan kembali oleh DNA ligase (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Perbaikan DNA dengan cara eksisi nukleotida DNA. Basa yang rusak merangsang pembentukan gelembung denaturasi yang diperlebar oleh enzim endonuklease, rangkaian nukleotida yang terdapat basa rusak dimetabolisme oleh eksonuklease, dilakukan resintesis oleh DNA polimerase dan penyambungan rantai DNA oleh DNA ligase (Brown, 2012).

c. Eksisi nukleotida pada rantai anak

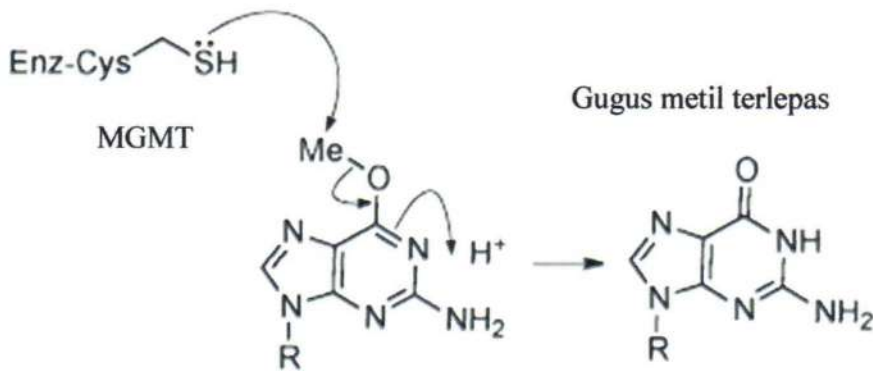
Perbaikan DNA dilakukan akibat salah pasangan basa antara rantai induk dan anak. Rangkaian nukleotida pada rantai anak yang terdapat basa salah pasangan diputus oleh enzim endonuklease dan dilepaskan oleh eksonuklease. Dilakukan pembentukan rangkaian nukleotida yang baru dan benar oleh enzim DNA polimerase dan disambungkan kembali oleh enzim ligase (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Perbaikan DNA salah pasang rantai induk dan anak dengan cara eksisi nukleotida DNA. Proses perbaikan sama dengan proses perbaikan DNA pada gambar 2.5, namun proses perbaikannya melalui pemutusan rantai DNA (Brown, 2012).

d. Demetilasi

Perbaikan demetilasi dilakukan pada rangkaian DNA yang mengalami hipermetilasi di *CpG islands*. Mekanismenya dapat bersifat aktif atau pasif. Demetilasi DNA secara aktif yaitu melepaskan basa sitosin yang termetilasi melalui proses oksidasi dan deaminasi. Celah yang kosong diisi dengan basa sitosin yang tidak termetilasi menggunakan enzim DNA polimerase dan DNA ligase. Cara pasif terjadi saat sel gagal melaksanakan metilasi selama proses replikasi DNA dengan dimediasi oleh enzim MGMT (Gong & Zhu, 2011). Mekanisme demetilasi dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Perbaikan DNA melalui proses demetilasi dengan menggunakan enzim MGMT (Brown, 2012).

2.1.3 Epidemiologi

Karsinoma nasofaring mempunyai karakter yang khas dengan ditandai oleh keterkaitan faktor etnis dan distribusi geografis. Keganasan ini merupakan penyakit yang jarang pada sebagian besar negara di dunia dengan insidens kurang dari 1 kasus / 100.000 penduduk (Hu, *et al.*, 2012). Insidens tertinggi di Guangdong (daerah Cina Selatan) yaitu 25-40 kasus / 100.000 penduduk per tahun. Daerah lainnya dengan insidens tinggi adalah Alaska, Afrika Utara dan *Greenland* (Chou, *et al.*, 2008). Di Indonesia, insidens KNF sekitar 6,2 kasus / 100.000 penduduk per tahun dan terjadi 13.000 kasus baru per tahun (Hutajulu, *et al.*, 2011). Pada keganasan kepala dan leher, KNF menjadi urutan pertama dengan frekuensi sekitar 60% (Kentjono, 2010).

Penderita KNF laki-laki lebih banyak dibanding perempuan. Penelitian Zainal seperti dikutip oleh Hashim, *et al.*, (2012) di Malaysia, insidens penderita KNF laki-laki dibanding perempuan adalah 8,6 dan 2,5 kasus / 100.000 penduduk. Cho (2007) melaporkan penderita laki-laki dengan perempuan berbanding 2 dan 1. Hasil sama

dilaporkan Yu, *et al.*, seperti dikutip oleh Zeng dan Zeng (2010) bahwa laki-laki berisiko menderita KNF 2-3 kali lipat dibanding perempuan. Di Hongkong, KNF terjadi pada laki-laki dengan insidens 24,6 kasus / 100.000 penduduk (Kwong, *et al.*, 2002). Mulyarjo (2002) melaporkan perbandingan penderita KNF laki-laki dengan perempuan di Surabaya adalah 2:1.

Laporan RS Dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta selama tahun 1996–2005 didapatkan 1121 penderita KNF baru (Adham, *et al.*, 2012), sedangkan RS Dr. Soetomo Surabaya pada tahun 1997 mendapatkan 265 penderita baru dan frekuensi KNF sekitar 59,3-65,81% selama tahun 1981-1995 (Kentjono, 2010). Karsinoma nasofaring merupakan keganasan peringkat pertama bidang THT-KL di Indonesia, dapat mengenai semua usia dan jarang pada usia di bawah 20 tahun (Martini, 2010). Insidens KNF mulai meningkat pada usia 20-50 tahun. Pada umumnya, KNF dijumpai pada usia produktif yaitu 30-59 tahun (sekitar 80%), dengan puncak usia antara 40-49 tahun (Cho, 2007; Kentjono, 2010).

2.1.4 Etiologi

Perbedaan geografis dan distribusi etnis mencerminkan etiologi multifaktor KNF yang meliputi infeksi EBV, etnis, kelainan genetik, faktor lingkungan dan konsumsi makanan (Tulalamba & Janvilisri, 2012). Tiga etiologi utama KNF adalah kerentanan genetik, faktor lingkungan dan infeksi laten EBV (Zhang, *et al.*, 2012). Karsinoma nasofaring berasosiasi dengan EBV, sekitar 95% penderita KNF terinfeksi EBV. Paparan nitrosamin pada makanan yang diasinkan dan diawetkan sebagai etiologi kuat dari faktor lingkungan (Chou, *et al.*, 2008). Kedua faktor ini diduga secara langsung atau tidak langsung berkontribusi terhadap kelainan genetik didapat

(*acquired*) atau perubahan epigenetik yang menyebabkan inisiasi dan progresi KNF (Lo, Chung & To, 2013). Ketiga etiologi tersebut menjadi dasar penelitian mengenai mekanisme molekuler perkembangan dan progresivitas KNF (Wang, *et al.*, 2010).

Infeksi laten EBV diketahui berhubungan erat dengan KNF. Virus ini dapat ditemukan pada lebih dari 90% orang dewasa di dunia dan lebih 95% penderita KNF tipe *undifferentiated carcinoma* dengan EBV positif. Produk EBV yang diketahui sebagai penyebab tumorigenesis adalah *latent membrane proteins* (LMP) 1, 2 dan 2B dengan biomarker terpenting adalah LMP1. Protein ini mempunyai aktivitas mencegah apoptosis, meningkatkan progresi tumor dan potensi metastasis. Penelitian mendapatkan bahwa penghambatan LMP1 dapat meningkatkan sensitivitas tumor terhadap kemoterapi (Chou, *et al.*, 2008). Penelitian Hutajulu, *et al.*, (2011) mendapatkan EBV terdeteksi pada 49 (98%) dari 50 penderita KNF, sedangkan 4 (16%) dari 25 sampel orang sehat ditemukan titer EBV yang tinggi.

Karsinogen lingkungan merupakan kofaktor dan pemicu kejadian KNF. Faktor kebiasaan makan, gaya hidup dan status ekonomi mempunyai kontribusi timbulnya KNF. Kebiasaan mengkonsumsi makanan yang banyak mengandung nitrosamin (diawetkan, diasinkan, diasap) atau tanaman mengandung *volatile nitrosamine* meningkatkan insidens KNF di daerah tertentu. Faktor lain adalah paparan debu yang mengandung logam berat dan asap pembakaran bahan tertentu (Kentjono, 2010). Paparan karsinogen lingkungan dalam waktu lama atau sejak masa anak berkontribusi meningkatkan infeksi laten EBV dan memicu perubahan gen dan epigenetik sehingga terjadi KNF (Hu, 2010).

Kerentanan genetik pada penderita KNF dihubungkan dengan subtipe HLA dan kelainan kromosom. Penelitian tentang kerentanan genetik HLA terhadap KNF menunjukkan perbedaan pada etnis dan daerah tertentu. Kehilangan alel pada HLA menyebabkan kegagalan interaksi kompleks HLA-peptida dengan limfosit T ($CD8^+$ dan $CD4^+$) sebagai sel imunokompeten. Kelainan genetik tersebut menyebabkan sel imunokompeten tidak dapat mendeteksi sel terinfeksi EBV dan keberadaan sel kanker sehingga lolos dari penghancuran (Kentjono, 2010). Kelainan kromosom berupa hilang atau bertambahnya alel dapat mempengaruhi aktivitas onkogen dan TSG (Lo, Chung & To, 2013). Kontribusi infeksi laten EBV dan karsinogen lingkungan terhadap perubahan epigenetik diketahui dari banyak penelitian. Perubahan tersebut berupa delesi, mutasi poin, hipo dan hipermetilasi DNA gen *promoter* (Das & Singal, 2004).

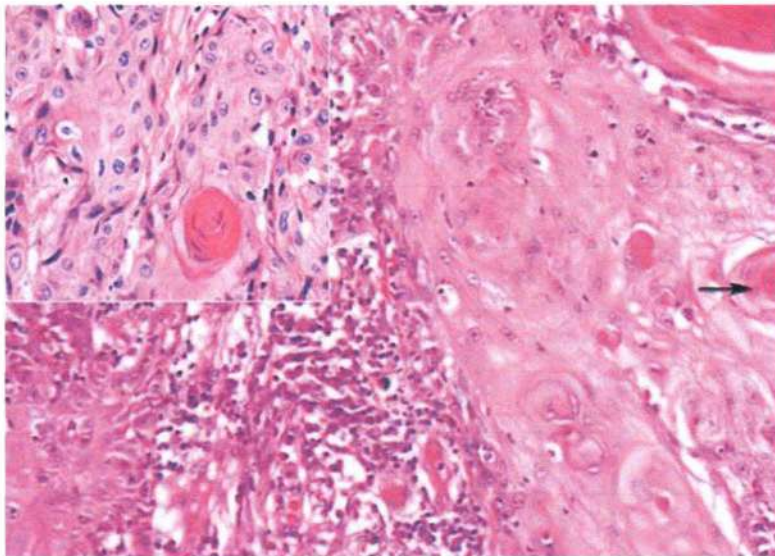
2.1.5 Histopatologi

World Health Organization mengklasifikasikan KNF dalam 3 tipe histologi yaitu tipe 1 atau *keratinizing squamous carcinoma*, tipe 2 atau *non keratinizing squamous carcinoma* dan tipe 3 atau *undifferentiated carcinoma*. Tipe 2 dan 3 mempunyai keterkaitan dengan infeksi EBV, sedangkan tipe 1 secara umum tidak didapatkan infeksi EBV khususnya di daerah nonendemik (Zeng & Zeng, 2010). Hal ini memunculkan dugaan bahwa tipe 1 disebabkan mutasi genetik secara spontan atau induksi bahan kimiawi karsinogenik (Kentjono, 2010).

a. Tipe *keratinizing squamous carcinoma*

Tipe ini mempunyai insidens 5-10% semua kasus KNF dengan karakteristik derajat diferensiasi sel sangat baik, memproduksi keratin dan terdapat jembatan

interseluler. Pada daerah endemis KNF insidensnya sekitar 1-2% sedangkan di Amerika utara bisa mencapai 25% (Robinson, *et al.*, 2013). Penelitian menunjukkan tipe ini sering mengenai usia lanjut yaitu diatas 60 tahun (Umar & Ahmed, 2014). *Keratinizing squamous carcinoma* sering didapatkan penyebaran lokoregional dan mempunyai prognosis yang buruk dengan angka kelangsungan hidup 5 tahun yang rendah. Tipe 1 sering dihubungkan dengan kebiasaan merokok dan konsumsi alkohol (Tse, *et al.*, 2006). Penelitian terbaru menunjukkan keterlibatan HPV pada tipe 1 (Laantri, *et al.*, 2011; Robinson, *et al.*, 2013). Gambaran histopatologi KNF WHO tipe 1 dapat dilihat pada Gambar 2.7.

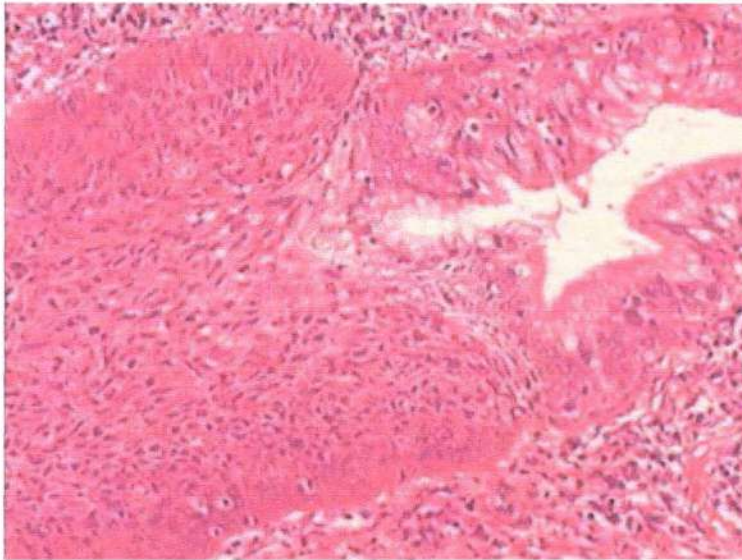


Gambar 2.7 Histopatologi KNF WHO tipe 1 dengan pewarnaan hematoksilin eosin pembesaran 200X, tampak sel dengan derajat diferensiasi baik. Tanda panah dan gambar *insert* (pembesaran 400X) menunjukkan pembentukan keratin (Umar & Ahmed, 2014).

b. Tipe *non keratinizing squamous carcinoma*

Tipe ini ditandai variasi diferensiasi sel dari matur hingga anaplastik dan tidak produksi keratin. Sel-sel ganas tersusun secara stratifikasi atau berimpit menyerupai

gambaran karsinoma sel transisional (Osman, *et al.*, 2012). Angka kelangsungan hidup 5 tahun dan prognosis lebih baik dibanding tipe 1 dan jarang mengalami metastasis jauh (Zeng & Zeng, 2010). Gambaran histopatologi KNF WHO tipe 2 dapat dilihat pada Gambar 2.8.

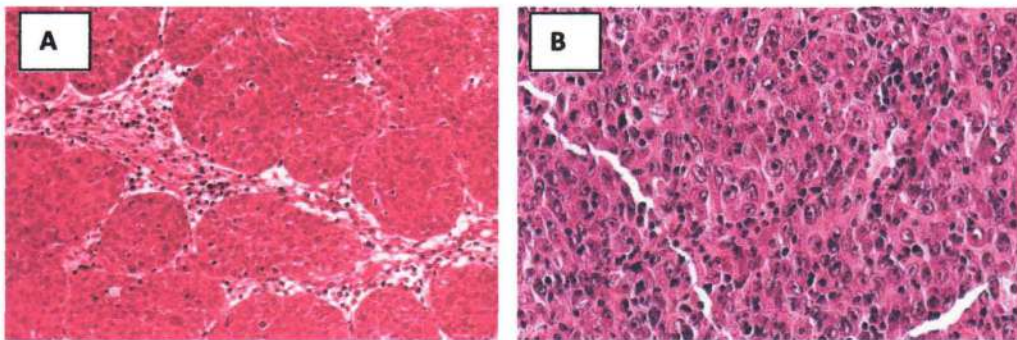


Gambar 2.8 Histopatologi KNF WHO tipe 2 dengan pewarnaan hematoksinilin eosin pembesaran 200X, tampak sel dengan variasi diferensiasi dari matur hingga anaplastik (Osman, *et al.*, 2012).

c. Tipe *undifferentiated carcinoma*

Tipe ini ditandai tidak produksi keratin, sedikit diferensiasi dan terdapat berbagai macam sel (*clear cell*, sel spindel dan anaplastik). Sel-sel tumor dengan bentuk inti oval atau bulat vesikular dengan anak inti menonjol. Batas antar sel tidak jelas dan dengan hubungan antar sel yang sinsitial. Tipe 3 sering disebut sebagai tipe limfoepitelial karena banyaknya infiltrasi limfosit pada tumor primer (Zeng & Zeng, 2010). Pola pertumbuhan *undifferentiated carcinoma* terdiri atas 2 subgrup yaitu tipe Regaud yang terdiri dari kumpulan sel-sel epiteloid dengan batas jelas dikelilingi oleh

jaringan ikat fibrous dan sel-sel limfosit, sedangkan berikutnya tipe Schmincke yang terdiri sel-sel epitelial neoplastik tumbuh difus dan bercampur dengan sel-sel radang. Tipe Schmincke lebih sering dijumpai dan terkadang kedua tipe bercampur dalam satu tumor (Brennan, 2006). Tipe 3 sering menyebabkan metastasis jauh namun mempunyai angka kelangsungan hidup dan prognosis terbaik diantara tipe yang lain. Soetjipto (1989) dan Kentjono (2010) melaporkan tipe 3 paling banyak ditemukan di Indonesia, disusul tipe 2 kemudian tipe 1. Gambaran histopatologi KNF WHO tipe 3 dapat dilihat pada Gambar 2.9.



Gambar 2.9 Histopatologi KNF WHO tipe 3. A. Tipe Regaud terdiri dari sel-sel yang membentuk sarang padat. B. Tipe Schminck terdiri dari terdiri sel-sel yang tumbuh membentuk gambaran sinsisial yang difus. Kedua subgroup ini tidak didapatkan produksi keratin (Osman, *et al.*, 2012).

2.1.6 Diagnosis

a. Anamnesis

Gejala klinis yang lengkap dan informatif dapat diketahui dengan anamnesis dan pemeriksaan fisik yang cermat. Penemuan KNF dalam stadium dini akan mempengaruhi prognosis. Gejala dini KNF adalah gejala hidung dan gejala telinga.

Gejala hidung dan gejala telinga pada penderita berisiko tinggi memberikan kecurigaan terhadap KNF. Anamnesis yang informatif mengenai trias gejala yang merupakan gabungan gejala dini dan gejala lanjut memberikan dugaan sangat kuat timbulnya KNF (Mulyarjo, 2002; Kentjono, 2010).

b. Tanda dan gejala klinis

Presentasi tanda dan gejala KNF meliputi pembesaran KGB leher, *painless*, hidung buntu, epistaksis, gangguan pendengaran, tinitus, otitis media rekuren, gangguan saraf kranial, nyeri tenggorok dan nyeri kepala (Cho, 2007). Chan, Teo dan Johnson (2002) menerangkan gejala KNF tersering berupa pembesaran KGB leher diikuti oleh gejala hidung, gejala telinga dan gejala neurologis. Kentjono (2010) membagi tanda dan gejala KNF menjadi gejala hidung, gejala telinga, gejala tumor leher, gejala mata, gejala kranii dan saraf kranial.

Dugaan kuat suatu KNF bila didapatkan trias gejala yaitu 1) tumor leher, gejala telinga, gejala hidung, 2) gejala intrakranial, gejala telinga, gejala hidung, 3) tumor leher, gejala intrakranial, gejala hidung atau gejala telinga. Gejala hidung berupa pilek lama dengan ingus bermanah atau bercampur darah, hidung buntu dan sengau. Gejala telinga meliputi telinga terasa penuh, tinitus, nyeri telinga, otitis media dan penurunan pendengaran. Gejala intrakranial terjadi akibat perluasan atau ekspansi tumor ke intrakrania. Gejala tersebut dapat berupa sindrom yaitu 1) sindrom petrosfenoid (lesi N. III, IV, V, dan N. VI) akibat perluasan ke superior melewati foramen laserum, 2) sindrom retroparotidian atau sindrom Jackson (lesi N. IX, X, XI, dan N. XII) akibat perluasan ke posterolateral melewati foramen juguiare, 3) sindrom

Horner (kelumpuhan saraf simpatikus servikalis) berupa penyempitan fisura palpebralis, enoftalmi dan miosis (Kentjono, 2010).

Tumor leher (khas terletak di bawah prosesus mastoid dan di belakang angulus mandibula) merupakan keluhan penderita KNF untuk mencari pengobatan dan biasanya datang dalam keadaan stadium lanjut. Keterlambatan pengobatan KNF dapat terjadi karena faktor pasien dan tenaga medis yang kurang memahami tanda dan gejala KNF. Kondisi semakin buruk apabila didapatkan gejala obstruksi jalan napas atas dan jalan makanan (akibat pembesaran tumor) dan metastasis jauh (sekitar 4-47%) (Kentjono, 2010). Penelitian di Cina Selatan mendapatkan metastasis jauh pada KNF sebesar 5% (Chan, Teo & Johnson, 2002). Target organ metastasis jauh pada KNF tersering adalah tulang (vertebra torako-lumbal) kemudian diikuti paru, hati dan KGB retroperitonal. Metastasis jauh merupakan penyebab tersering kematian pada KNF (Kentjono, 2010; Zhou, *et al.*, 2013).

c. Pemeriksaan nasofaring

Pemeriksaan nasofaring yang dikerjakan dengan teliti merupakan prosedur sangat penting. Pemeriksaan dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Pemeriksaan tidak langsung dengan rinoskopi posterior menggunakan alat sederhana (kaca laring), namun membutuhkan keterampilan, kesabaran dan pasien kooperatif serta tidak sensitif. Nasofaringoskopi langsung menggunakan alat endoskopi yang kaku (*rigid nasopharyngoscope*) maupun lentur (*fiberoptic nasopharyngoscope*) digunakan melalui hidung (*transnasal*) atau mulut (*transoral*). Nasofaringoskopi langsung memberikan nilai keakuratan lebih baik saat melakukan biopsi. Alat ini

dapat digunakan untuk memeriksa rongga hidung, nasofaring dan laring namun harganya mahal (Kentjono, 2010).

d. Pemeriksaan radiologis

Chan, Teo dan Johnson (2002) menganjurkan melakukan pemeriksaan *computed tomography* (CT) *scan* dan *magnetic resonance imaging* (MRI) dengan fokus nasofaring dan basis kranii sebelum melakukan biopsi. Hal tersebut bertujuan mencegah bias karena biopsi dapat menimbulkan pembengkakan mukosa atau hematom pada mukosa nasofaring. Tanda patognomonis keganasan nasofaring berupa gambaran asimetri resesus lateralis, torus tubarius, dinding posterior dan terdapat pembengkakan pada otot-otot tensor dan levator veli palatini (Gambar 2.10). Perluasan tumor dapat dievaluasi dengan CT *scan* atau MRI. Keunggulan MRI dibanding CT *scan* adalah lebih sensitif terhadap jaringan lunak sehingga tumor berukuran kecil di nasofaring dapat diketahui, sedangkan keunggulan CT *scan* adalah pencitraan lebih baik terhadap jaringan tulang (Chan, Teo & Johnson, 2002).



Gambar 2.10 Pencitraan dengan CT *scan* potongan aksial dengan kontras tampak massa di nasofaring ditunjukkan tanda panah merah, sedangkan pencitraan dengan MRI potongan koronal tampak massa nasofaring yang meluas ke parafaring sisi kiri ditunjukkan tanda panah biru (Chan, *et al.*, 2012).

Pemeriksaan CT *scan* dan MRI juga diperlukan pasca pemberian terapi untuk mendapatkan informasi tentang kondisi tumor primer. Indikasi lain pemeriksaan radiologis adalah memberikan gambaran informatif pada pasien curiga KNF namun tidak sesuai dengan kondisi klinis dan CT *scan* menjadi landasan untuk pelaksanaan radioterapi (Chan, Teo & Johnson, 2002). Pemeriksaan foto toraks dan pemeriksaan *ultra sonography* (USG) *upper* dan *lower abdomen* berguna untuk mengetahui metastasis jauh pada KNF (Mulyarjo, 2002). Di Indonesia, CT *scan* masih tergolong mahal dan terbatas di daerah tertentu sehingga tidak mungkin digunakan sebagai pemeriksaan rutin untuk diagnosis dini (Kentjono, 2010).

e. Biopsi nasofaring

Terdapat beberapa macam cara pengambilan bahan untuk pemeriksaan histologis dan sitologi pada nasofaring yaitu biopsi, cara cucian, cara hisapan dan

cara sikatan. Biopsi dapat dengan cara memakai alat sederhana (biopsi buta), biopsi buta terpimpin, biopsi dengan nasofaringoskopi direkta dan biopsi dengan fiber laringoskop (Kentjono, 2010). Konfirmasi penemuan klinis kemudian harus dikonfirmasi dengan hasil histologi dari biopsi nasofaring sebagai diagnosis pasti KNF. Teknik biopsi dapat dilakukan dengan anestesi lokal atau general (Chan, Teo & Johnson, 2002).

f. Pemeriksaan serologis

Karsinoma nasofaring berhubungan erat dengan EBV sebagai salah satu etiologi. Pemeriksaan serologi tentang EBV memberikan manfaat diagnosis dan prognosis, bahkan dapat juga digunakan sebagai skrining. Pemeriksaan antibodi sebagai *tumor marker* yang paling bermanfaat untuk diagnosis KNF adalah imunoglobulin (Ig) A anti EBV *viral capsid antigen* (VCA) dan IgA anti EBV *early antigen* (EA). Imunoglobulin A anti EBV VCA sangat spesifik sebagai *tumor marker* untuk diagnosis dini, bernilai positif bila titer lebih dari 5. Beberapa penelitian melaporkan antibodi tersebut mempunyai sensitivitas sebesar 97,2% dan spesifisitas 93,3% terhadap KNF terutama tipe 3 (Kentjono, 2010).

Individu berisiko tinggi sangat dicurigai menderita KNF bila didapatkan peningkatan titer antibodi IgA anti EBV VCA dan IgA anti EBV EA yang tinggi, bila terbukti KNF segera diberikan pengobatan definitif. Titer antibodi spesifik terhadap EBV ini dapat diperiksa dengan menggunakan berbagai macam cara antara lain *immunofluorosensi*, *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *radio-immuno assay*. Beberapa antibodi terhadap EBV pada KNF ternyata sangat spesifik, tidak dijumpai pada keganasan di daerah kepala dan leher lainnya (Kentjono, 2010).

2.1.7 Klasifikasi stadium

American Joint Committee on Cancer Staging and End Result Reporting/ International Union Against Cancer (AJCC/IUAC) dan *National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guide line* tahun 2011, membagi stadium KNF berdasarkan tumor primer (T), nodul leher (N) dan metastasis jauh (M) seperti pada Tabel 2.1 dan pembagian stadium KNF pada Tabel 2.2.

Tabel 2.1 Penilaian T, N dan M pada KNF (NCCN, 2011).

T, N, M	Keterangan
Tx	Tumor primer tidak dapat dinilai
T0	Tidak didapatkan tumor primer
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor terbatas pada nasofaring, atau meluas pada orofaring dan/atau kavum nasi, tanpa perluasan ke parafaring
T2	Tumor dengan perluasan parafaring
T3	Tumor menginvasi struktur tulang pada dasar tengkorak dan/atau sinus paranasal
T4	Tumor meluas sampai ke intrakranial dan/atau invasi pada saraf kranialis, hipofaring, orbita atau dengan perluasan ke fosa infratemporal/ ruang mastikator
Nx	Nodul limfe servikal tidak dapat dinilai
N0	Tidak didapatkan pembesaran nodul limfe servikal
N1	Nodul limfe servikal unilateral, ≤6cm, diatas fosa supraklavikula, dan/ atau unilateral atau bilateral, nodul limfe retrofaring, ≤6cm, pada ukuran terbesar
N2	Nodul limfe servikal bilateral, ≤6cm pada ukuran terbesar, diatas fosa supraklavikula
N3	Nodul limfe servikal, >6cm, dan/atau menuju fosa supraklavikula
N3a	Ukuran >6cm
N3b	Perluasan ke fosa supraklavikula
M0	Tidak ada metastasis
M1	Metastasis jauh

Tabel 2.2 Kelompok stadium KNF menurut sistem *American Joint Committee on Cancer Staging and End Result Reporting/ International Union Against Cancer (AJCC/IUAC)* dan *National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2011)*.

Kelompok Stadium	Tumor (T)	Nodul (N)	Metastasis (M)
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 IVB	Semua T	N3	M0
Stadium IVC	Semua T	Semua N	M1

2.1.8 Terapi

Penanganan KNF saat ini terdiri atas terapi utama dan paliatif. Terapi utama meliputi radioterapi, kemoterapi, pembedahan dan *targeted therapy*. Radioterapi merupakan pilihan pertama penanganan KNF terutama yang belum terjadi metastasis jauh. Pemilihan radioterapi didasarkan pada histopatologi KNF terbanyak adalah WHO tipe 3 dan 2 yang radiosensitif. Karsinoma nasofaring termasuk kanker yang dapat disembuhkan dengan penyinaran (*radiocurable*) terutama bila masih dini (stadium I dan II). Pembedahan ekstensif untuk mendapatkan daerah bebas tumor

pada KNF sangat sulit dikerjakan karena secara anatomi letak nasofaring berada di bawah dasar tengkorak dengan banyak organ vital. Keberhasilan radioterapi ditentukan oleh eradikasi semua sel kanker yang *viable* (Kentjono, 2012).

a. Radioterapi

Radioterapi konvensional (eksternal) dengan menggunakan teknik *two dimensional* (2D) berdosis radiasi 60-70 Gy (2-2,5 Gy per fraksi selama 6-7 minggu) mampu memberikan efek tumorisidal. Radiasi ditujukan pada tumor primer dan struktur anatomi yang berisiko terinvansi tumor di sekitar nasofaring dengan melindungi organ vital dan daerah leher yang terdapat korda spinal dan laring. Teknik ini dapat memberikan angka kontrol lokal sebesar 80% pada penderita KNF (Chan, Teo & Johnson, 2002). Mäkitie, *et al.*, (2003) melaporkan penderita KNF dengan radioterapi konvensional secara keseluruhan mempunyai angka bertahan hidup selama 5 tahun sekitar 70%.

Tumor yang lebih besar (stadium III dan IV) diberikan dosis radiasi sebesar 70-75 Gy dan bila tidak didapatkan metastasis KGB leher (N0) diberikan radiasi profilaksis sebesar 40-50 Gy dalam 4-4,5 minggu. Karsinoma nasofaring dengan metastasis KGB leher diberikan dosis sama dengan tumor primer sebesar 60-75 Gy. Evaluasi hasil radioterapi menggunakan *CT scan*, bila didapatkan residu tumor di nasofaring saja maka penderita beristirahat dulu selama 1-2 minggu, kemudian diberi radiasi tambahan terbatas pada tumor sebesar 10-15 Gy sehingga tercapai dosis total 75-80 Gy (Kentjono, 2012).

Teknik radiasi dikembangkan untuk meningkatkan kontrol tumor dengan menggunakan *accelerated fractionation radiotherapy* dan *dose escalation*. Teknik

accelerated fractionation radiotherapy memberikan dosis radiasi lebih besar 300 cGy atau lebih per fraksi (5 kali per minggu) sehingga masa terapi menjadi lebih singkat (3-4 minggu). Teknik lain dengan *accelerated hyperfractionation radiotherapy* berdosis 160-180 cGy per fraksi diberikan 2 kali per hari sehingga masa terapi menjadi lebih pendek lagi. Kelemahan dua terapi ini adalah peningkatan efek samping radiasi. Teknik *dose escalation* berupa *stereotactic radiotherapy boost* dan *brachytherapy* (radiasi internal) dinilai memberikan efektivitas dan keakuratan yang lebih baik (Kentjono, 2012).

Penanganan radioterapi pada KNF memberikan hasil baik dengan menggunakan *3 dimensional conformal radiotherapy* (3 DCRT) yang dapat menunjukkan perluasan tumor secara teliti dalam 3 dimensi. Dengan teknik 3 DCRT, dilaporkan angka kelangsungan hidup 5 tahun penderita KNF mencapai 80% di Hongkong. Teknik radioterapi baru yaitu *intensity modulated radiotherapy* (IMRT) menghasilkan kontrol lokoregional lebih baik dibanding 3 DCRT. Teknik IMRT yang dikombinasi dengan pemberian kemoterapi mendapatkan angka bertahan hidup 3 tahun sebesar 100%. Radioterapi terbaru berupa *image guided radiation therapy* (IGRT) menggunakan CT scan 4 dimensi dilaporkan sangat presisi namun masih dalam penelitian terbatas (Kentjono, 2012).

b. Kemoterapi

Kemoterapi diberikan secara kombinasi dengan radioterapi (*integrated chemo-radiotherapy*) terbagi dalam 1) kemoterapi neoadjuvan (induksi) yaitu memberikan kemoterapi dulu kemudian radioterapi bertujuan mengurangi besarnya tumor sebelum radioterapi, 2) kemoterapi konkuren (konkomitan) yaitu kemoterapi

diberikan bersama dengan radioterapi dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap kemoradiasi, dan 3) kemoterapi adjuvan yaitu kemoterapi diberikan setelah terapi definitif. Masing-masing terapi tersebut mempunyai keuntungan dan kerugian. Kesepakatan pakar menganjurkan pemberian kemoterapi dengan kombinasi *cisplatin* dan *5-fluorouracil* serta radioterapi menggunakan IMRT (Kentjono, 2012).

c. Terapi lain

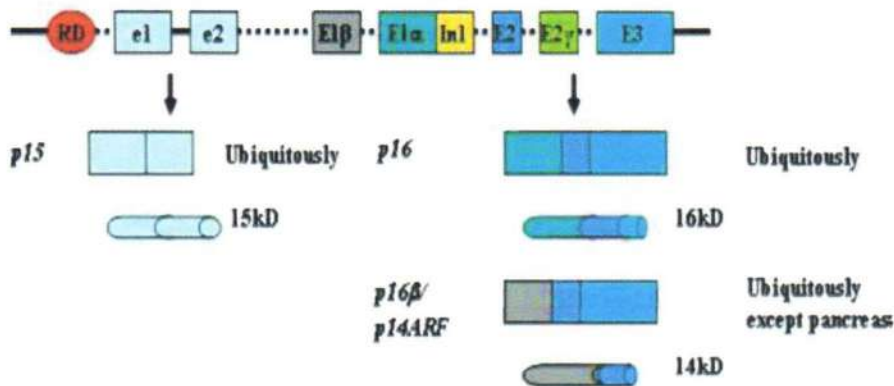
Terapi KNF yang lain adalah *targeted therapy*, pembedahan, dan paliatif. *Targeted therapy* merupakan substansi yang menghalangi pertumbuhan dan penyebaran kanker dengan menginterferensi molekul spesifik sehingga proliferasi sel kanker terhenti. Pembedahan nasofaringektomi diindikasikan untuk KNF stadium dini persisten atau rekuren pasca radioterapi dosis lengkap. Diseksi leher radikal dapat dilakukan bila tumor persisten atau rekurensi di kelenjar leher dan tumor primer di nasofaring sudah terkontrol (Kentjono, 2012). Terapi paliatif dilakukan untuk mengurangi penderitaan pasien KNF baik penderitaan fisik, jiwa dan sosial. Terapi ini terutama untuk menghilangkan nyeri dan terapi suportif agar pasien dapat menjalani aktivitas sehari-hari dengan normal (Mulyarjo, 2002).

2.2 Gen p16

2.2.1 Struktur

Berdasar peran aktivasi atau inhibisi proliferasi sel, gen kanker terbagi menjadi 2 kelompok yaitu onkogen dan proto onkogen antara lain TSG. Gen p16 merupakan salah satu TSG yang berperan dalam regulasi siklus sel dan bertanggung jawab dalam kontrol proliferasi serta penuaan sel atau *senescence* (Rayess, Wang &

Srivatsan, 2012). Gen ini dikode oleh kromosom 9p21 dan mempunyai struktur hampir mirip dengan gen p14. Struktur gen p16 terdiri dari 3 ekson meliputi ekson 1 α , 2 dan 3, sedangkan struktur gen p14 untuk ekson 1 α diganti dengan 1 β (Ko, *et al.*, 2002). Gen p14 (*alternative reading frame* atau ARF) berperan meningkatkan p53 dan menekan *human double minute* (HDM) 2 atau ubikuitin ligase. Penurunan p14 berakibat peningkatan HDM2 yang dapat merusak p53 di sitoplasma sel (Poi, *et al.*, 2001). Struktur gen p16 dapat dilihat pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Struktur gen p16 terdiri ekson 1 α , 2, 3 dan intron. Perbedaan dengan TSG yang lain (misal p15 dan p14^{ARF}) yaitu pada ekson 1 dan berat molekul. Bentuk kotak menggambarkan DNA dan mRNA (Li, Poi & Tsai, 2011).

Ekson merupakan bagian dari gen yang berperan dalam pengkodean protein saat proses replikasi DNA berlangsung. Selain ekson, suatu gen dapat memiliki intron yang tidak dapat mengkode protein. Intron berada di antara 2 ekson, saat proses replikasi DNA terjadi intron menghilang sehingga antar ekson akan terhubung. Semakin banyak intron yang didapatkan dalam gen suatu organisme maka semakin kompleks organisme tersebut (Zhu, *et al.*, 2009). Tiap ekson pada gen p16 memiliki

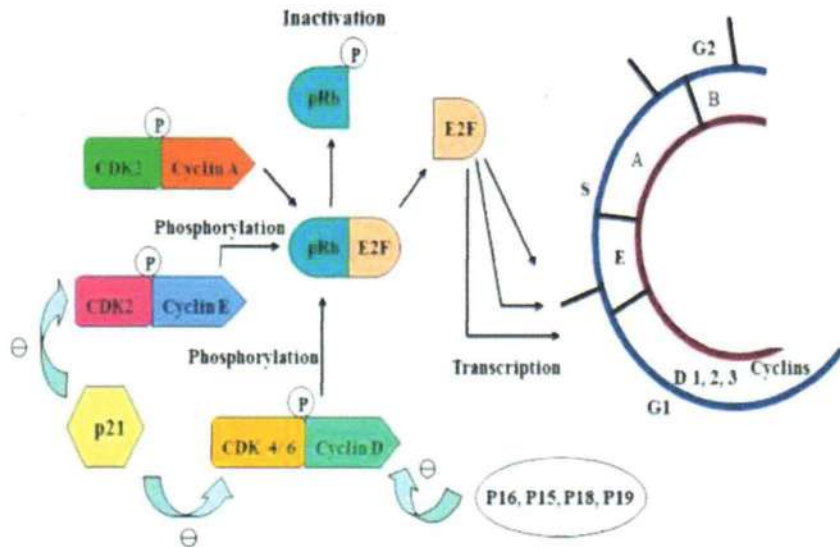
urutan nukleotida dengan berat fragmen tertentu yang hampir mirip gen p14, hanya perbedaannya pada bagian ekson 1 (Poi, *et al.*, 2001). Urutan nukleotida tiap ekson gen p16 pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Urutan oligonukleotida tiap ekson gen p16 (Attri, *et al.*, 2005).

Gen	Ekson	Sekuen DNA (5'-3')	Ukuran fragmen (bp)
p16	1	CGGAGAGGGGGAGAACAGAC CTGGATCGGCCTCCGACCGTAAC	189
	2	TGAGGGACCTTCCGCGGC GTCATGATGATGGGCAGCGC	307
	3	CACATCCCCGATTGAAAGAAC CAGTGAATGAATGAAAATTA	489

2.2.2 Fungsi

Fungsi gen p16 berhubungan dengan pengendalian proliferasi sel melalui regulasi siklus sel. Gen ini memproduksi p16, protein ini disebut juga *cyclin kinase inhibitors* (INK) 4a sedangkan gen p15 yang memproduksi p15 (INK4b) mempunyai fungsi sama dengan gen p16. Gen p15 dikode oleh kromosom 9p22. Kedua protein ini berfungsi sebagai regulator siklus sel dari fase G1 ke fase S. Protein 16 memblokir ikatan antara *cyclin* D1 dengan *cyclin dependent kinase* (CDK) 4. Ikatan faktor transkripsi E2F dengan pRb difosforilasi oleh p16 sehingga E2F terlepas di sitoplasma sel. Faktor transkripsi E2F merupakan akselerator siklus sel fase G1 ke fase S dan segera menuju fase G2. Pada fase S, sel mengalami duplikasi pada 46 kromosom (Agarwal, *et al.*, 2012). Fungsi gen p16 dalam pengaturan siklus sel dapat dilihat pada Gambar 2.12.

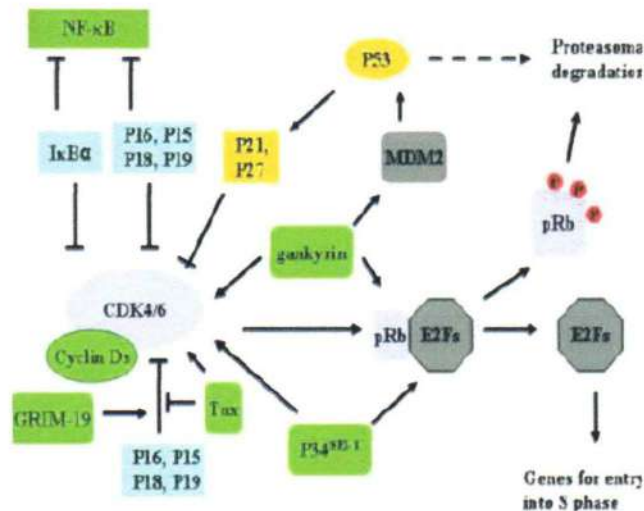


Gambar 2.12 Fungsi gen p16 dalam pengaturan siklus sel. Gen p16 menghambat Cyclin D terutama D1 sehingga memicu fosforilasi ikatan pRb-E2F. Faktor transkripsi E2F terlepas sehingga dapat mengakselerasi siklus sel fase S menuju fase G2 (Li, Poi & Tsai, 2011).

Selain gen p16 (CDKN2A), juga ada gen lain dalam mengatur proliferasi sel yaitu gen p18 dan p19. Kedua gen ini juga menghambat ikatan CDK 4-*cyclin* D1 dan mediator inflamasi NFκB. Gen p18 dikode oleh kromosom 1p32 sedangkan gen p19 oleh kromosom 19p13.2. Ekspresi protein produk kedua gen tersebut (p18 dan p19) berbeda dengan p16 dalam regulasi siklus sel. Ekspresi p18 dan p19 sangat rendah saat fase G1 namun meningkat cepat saat transisi fase G1-S serta mencapai maksimal pada fase S, sedangkan ekspresi p16 sangat tinggi saat akhir fase G1. Ekspresi p15 akan meningkat dipicu oleh TGFβ dan juga mempunyai peran menghambat NFκB. Gen p16 dan p18 juga mempunyai peranan dalam proses diferensiasi dan *senescence* sel (Li, Poi & Tsai, 2011).

Gen p21, p27 dan p53 juga mempunyai peranan dalam regulasi ikatan CDK4-*cyclin* D1. Protein 21 dan p27 merupakan inhibitor kompeten ikatan CDK4-*cyclin* D1

dengan cara mengikat CDK4. Kedua protein ini juga dapat menggeser ikatan p16-CDK4, memicu fosforilasi pRb dan mendorong secara langsung p16 ke arah degradasi. Gen p53 secara tidak langsung mempengaruhi fosforilasi pRb melalui modulasi gen p21 (Gambar 2.13). Gen p27 dapat dipengaruhi aktivitasnya oleh LMP1 melalui AKT8 *virus oncogene cellular homolog* (AKT) berupa degradasi p27 atau melokalisir p27 di sitoplasma sel. Penurunan ekspresi p27 merupakan predisposisi metastasis jauh sel tumor (Baba, *et al.*, 2001).



Gambar 2.13 Peran gen p16 dalam regulasi siklus sel beserta gen lainnya melalui inhibisi ikatan CDK4/6-*cyclin D*s. Gen p16 juga mempunyai peranan untuk menghambat NFκB (Li, Poi & Tsai, 2011).

Nuclear factor κB merupakan suatu faktor transkripsi pengontrol gen vital yang dibutuhkan untuk respon imun, inflamasi, diferensiasi, pertumbuhan sel, adesi sel dan apoptosis. Faktor transkripsi ini dapat memicu proses angiogenesis melalui *vascular endothelial cell growth factor* (VEGF) dan *cyclo-oxygenase* (COX) 2.

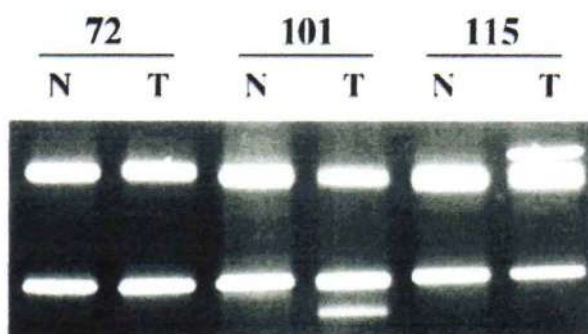
Peningkatan invasi dan metastasis jauh dapat juga dipicu NF κ B melalui *transforming growth factor* (TGF) β (Agarwal, *et al.*, 2012; Rothenberg & Ellisen, 2012). Gen p16 melalui p16 mampu mengikat dan mensupresi NF κ B. Inhibitor κ B alfa (I κ B α) adalah inhibitor spesifik NF κ B yang merupakan kompetitor p16 dalam menghambat NF κ B maupun mengikat CDK4, bahkan mampu menggantikan peran gen p16 (Li, Poi & Tsai, 2011).

Produk EBV yaitu LMP1 mempunyai peran sangat besar pada proses proliferasi sel KNF. Protein ini mampu menurunkan regulasi p21 dan p27 melalui penurunan p53 akibat Akt yang meningkat. Penurunan p53 meningkatkan *survivin* yang merupakan protein penghambat apoptosis. *Survivin* juga dapat ditingkatkan ekspresinya oleh LMP1. Peningkatan *survivin* mempunyai pengaruh besar terhadap penurunan p16 (Liu, *et al.*, 2015). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa LMP1 dapat menimbulkan delesi, hipermetilasi dan mutasi pada gen p16. Hal ini membuktikan bahwa EBV mempunyai pengaruh dalam perubahan genetik maupun epigenetik gen p16. Pengaruh ini berakibat inaktivasi gen sehingga terjadi penurunan regulasi dan ekspresi p16 (Bruce, *et al.*, 2015).

2.2.3 Pemeriksaan gen p16

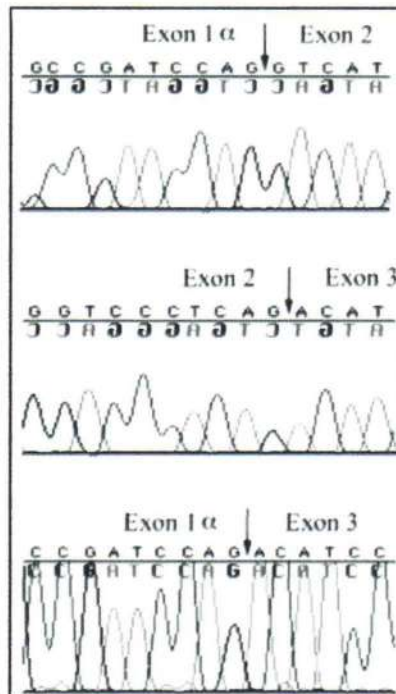
Prosedur pemeriksaan gen p16 terdapat beberapa tahapan meliputi proses ekstraksi DNA dari jaringan KNF, amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing DNA. Jaringan KNF berasal dari biopsi tumor primer yang tersimpan dalam *buffer* formalin. Ekstraksi DNA dilakukan juga pada sel nasofaring normal, hasilnya didapatkan 2 *template* DNA. Pemeriksaan PCR dapat menggunakan analisis *single-stranded conformation polymorphism* (SSCP) atau *cold*

SSCP. Pemeriksaan ini menghasilkan gambaran *double band shift* pada *template* tumor yang merupakan lokus bagian gen p16 yang akan dilakukan sekuensing. Bentuk *double band shift* dapat dilihat pada Gambar 2.14.



Gambar 2.14 Hasil PCR jaringan normal (N) dan tumor (T) dengan lokus mutasi INK4a/ARF pada karsinoma sel skuamosa daerah kepala dan leher. Tampak *double band shift* positif pada T yang menunjukkan lokus gen (Poi, *et al.*, 2001).

Mutasi poin diketahui dengan pemeriksaan analisis sekuensing DNA. Genom DNA diisolasi dari jaringan KNF kemudian dilakukan pemeriksaan pada spesifik ekson yang diduga mengalami mutasi dengan menggunakan *reverse transcriptase* (RT) PCR. Tahapan sekuensing melalui beberapa prosedur terlebih dahulu meliputi elektroforesis, purifikasi, labeling dan presipitasi. Proses elektroforesis menggunakan gel *agarose*. Bahan yang akan disekuensing dilakukan inkubasi suhu dingin. Hasil sekuensing berupa gambaran grafik dan urutan oligonukleotida baik normal maupun terdapat mutasi (Ko, *et al.*, 2002). Grafik hasil sekuensing yang terdapat mutasi gen p16 dapat dilihat pada Gambar 2.15.



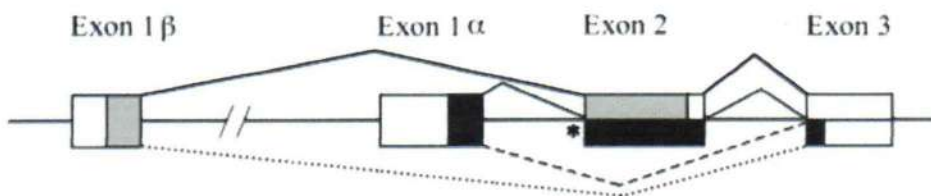
Gambar 2.15 Grafik hasil sekuensing gen p16 pada KNF yang didapatkan mutasi (anak panah). Tampak mutasi dapat melibatkan ekson 1 α , 2, dan 3 (Ko, *et al.*, 2002).

2.2.4 Mutasi gen p16 dan dampaknya

Mutasi gen p16 dapat disebabkan oleh karena faktor internal atau seluler dan eksternal. Faktor internal berupa mutasi spontan yang terjadi saat proses replikasi yaitu pada fase mitosis dan meiosis. Mutasi ini dapat berupa *missense*, *nonsense*, insersi, delesi, *frameshift* dan ekspansi pengulangan. Hal tersebut menimbulkan kelainan kromosom dan inaktivasi gen dengan mutasi tersering adalah mutasi poin di lokasi ekson 2 serta jarang di ekson 1 atau 3 (Ko, *et al.*, 2002). Faktor eksternal yang dapat menyebabkan mutasi adalah rokok, radiasi ion dan sinar ultra violet. Faktor eksternal memicu mutasi menyebabkan perubahan basa nukleotida dan bentuk DNA yang mengakibatkan kesalahan replikasi dan transkripsi (Loewe, 2008).

Mutasi gen diklasifikasikan menjadi mutasi herediter dan mutasi somatik. Mutasi herediter atau mutasi *germline* berarti mutasi gen sudah terdapat pada sel sperma atau sel telur orang tua. Saat pembuahan, DNA sel sperma dan sel telur bersatu. Hal ini berakibat setiap sel tubuh anak selalu didapatkan gen tertentu yang bermutasi dan mutasi gen akan terus berlangsung sepanjang kehidupan anak. Mutasi somatik atau mutasi didapat berarti mutasi gen terjadi di masa hidup. Mutasi gen hanya muncul pada sel tertentu dan tidak diturunkan pada generasi selanjutnya. Mutasi ini bisa berdampak sistemik dan mempengaruhi daya tahan hidup seperti mutasi gen pada sel kanker (Loewe, 2008).

Perbedaan mutasi poin dengan metilasi DNA pada suatu gen adalah metilasi letak kelainannya spesifik di *CpG islands* regio *promoter*, sedangkan mutasi poin letak mutasi di sisi salah satu rantai DNA (Widschwendter & Jones, 2002). Kegagalan *checkpoints* sebelum replikasi DNA dan pembelahan berakibat akumulasi kerusakan yang memicu mutasi (Clancy, 2008). Bentuk mutasi gen p16 dan p14 dapat berupa penggabungan atau *splicing* antar bagian ekson (Gambar 2.16).

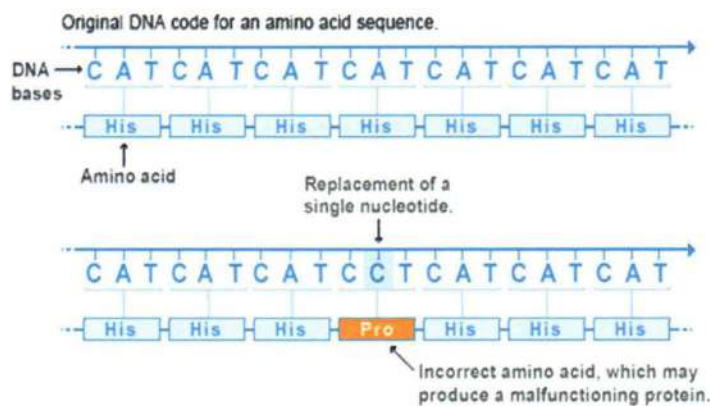


Gambar 2.16 Bentuk mutasi gen p16 (ekson 1 α -2-3) berupa penggabungan atau *splicing* (garis putus atau titik), lokasi tersering pada ekson 2 (Ko, *et al.*, 2002).

Bentuk mutasi pada rangkaian DNA gen p16 dapat sebagai berikut:

a. Mutasi *missense*

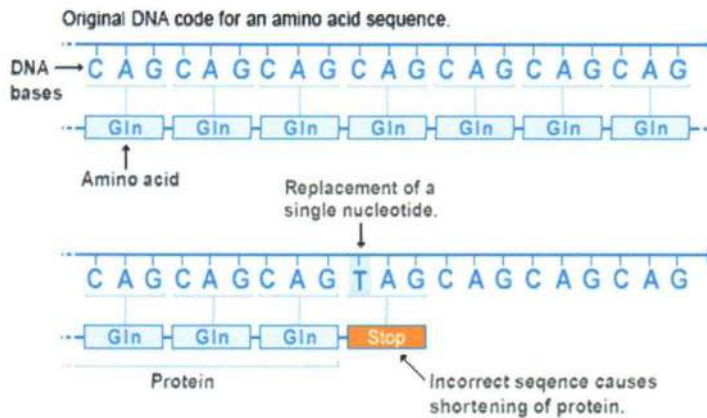
Tipe mutasi ini terjadi perubahan nukleotida yang mengakibatkan perubahan kodon sehingga menghasilkan asam amino berbeda. Mutasi *missense* mengakibatkan perubahan pembentukan protein yang dapat menguntungkan atau berbahaya. Mutasi *missense* seperti pada Gambar 2.17.



Gambar 2.17 Mutasi *missense*. Nukleotida adenin diganti sitosin di kode DNA menampilkan asam amino salah yaitu prolin sehingga protein menjadi malfungsi (US National Library of Medicine, 2008).

b. Mutasi *nonsense*

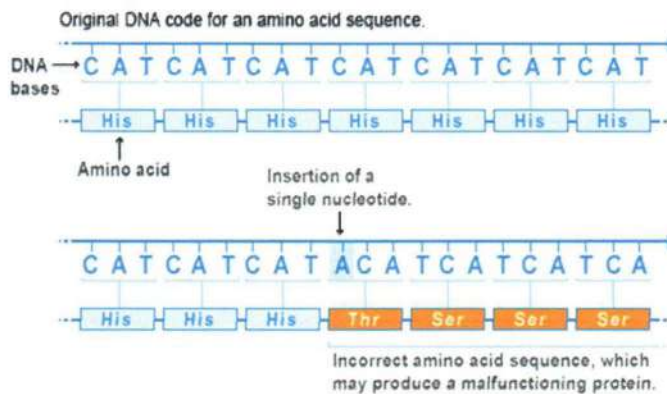
Tipe mutasi ini merubah suatu nukleotida sehingga menimbulkan kode kodon berhenti. Asam amino tidak terbentuk dan proses translasi dan transkripsi protein juga berhenti. Pemendekan protein mengakibatkan protein malfungsi. Mutasi *nonsense* seperti pada Gambar 2.18.



Gambar 2.18 Mutasi *nonsense*. Nukleotida sitosin diganti timin pada kode DNA memberikan sinyal ke sel untuk menghentikan sintesa protein (US National Library of Medicine, 2008).

c. Mutasi insersi

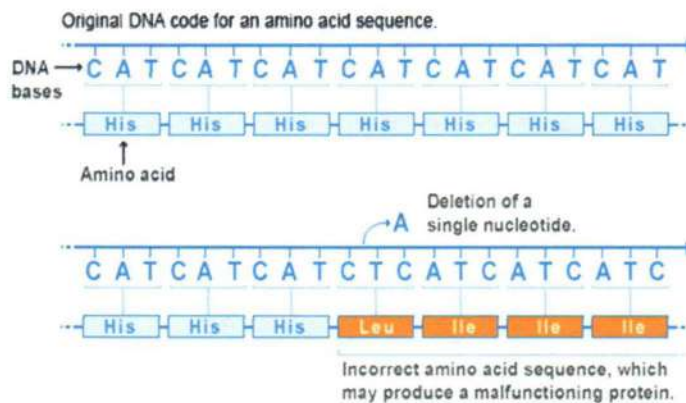
Tipe mutasi ini terjadi penambahan basa dalam rangkaian nukleotida di rantai DNA gen sehingga terbentuk rangkaian asam amino tak sesuai. Protein yang terbentuk menjadi malfungsi. Mutasi insersi dapat dilihat pada Gambar 2.19.



Gambar 2.19 Mutasi insersi. Satu nukleotida (adenin) ditambahkan pada kode DNA sehingga merubah rangkaian asam amino berikutnya berakibat malfungsi protein (US National Library of Medicine, 2008).

d. Mutasi delesi

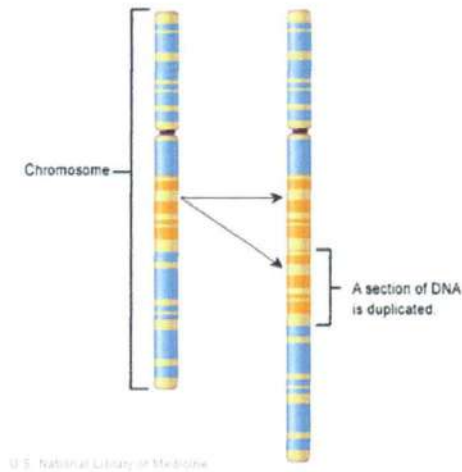
Tipe mutasi ini merubah rangkaian DNA dengan hilangnya suatu nukleotida menyebabkan perubahan asam amino yang terbentuk. Perubahan tersebut menghasilkan protein yang malfungsi. Mutasi delesi dapat dilihat pada Gambar 2.20.



Gambar 2.20 Mutasi delesi. Satu nukleotida (adenin) hilang dari kode DNA sehingga merubah rangkaian asam amino berikutnya berakibat malfungsi protein (US National Library of Medicine, 2008).

e. Mutasi duplikasi

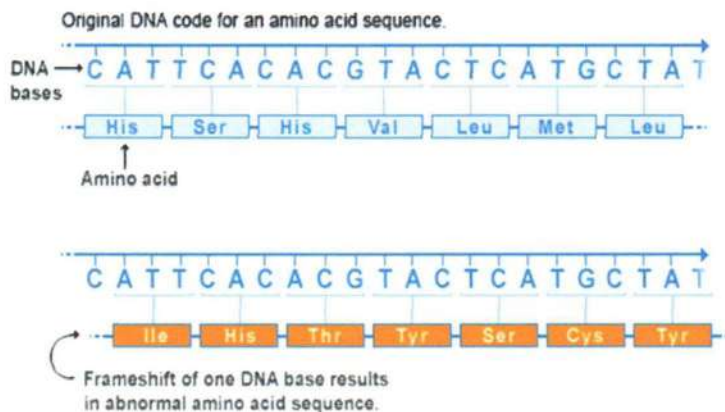
Tipe mutasi ini merubah rangkaian DNA akibat satu atau lebih nukleotida yang terkopi sekali atau lebih dan terjadi spontan saat proses replikasi. Perubahan ini menghasilkan protein yang malfungsi. Mutasi duplikasi dapat dilihat pada Gambar 2.21.



Gambar 2.21 Mutasi duplikasi. Suatu bagian DNA mengalami duplikasi secara spontan saat replikasi kromosom (US National Library of Medicine, 2008).

f. Mutasi *frameshift*

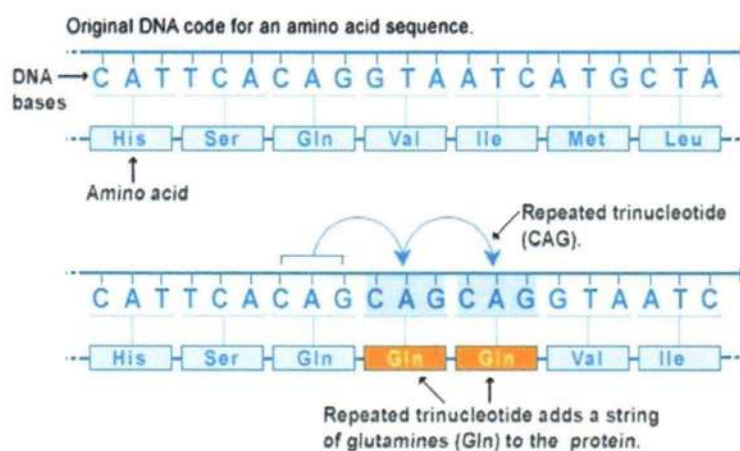
Tipe mutasi ini terjadi akibat penambahan atau pengurangan satu kodon (3 basa) dalam rangkaian DNA yang mengakibatkan pembentukan asam amino tidak sesuai. Perubahan ini menghasilkan protein malfungsi. Mutasi *frameshift* dapat dilihat pada Gambar 2.22.



Gambar 2.22 Mutasi *frameshift*. Kode DNA mengalami pergeseran dari sitosin ke adenin sehingga menimbulkan rangkaian asam amino abnormal (US National Library of Medicine, 2008).

g. Mutasi ekspansi pengulangan

Tipe mutasi ini terjadi pengulangan 3 atau 4 nukleotida dalam 1 baris rantai DNA menghasilkan asam amino sama yang berulang. Mutasi ini menghasilkan protein yang malfungsi. Mutasi ekspansi pengulangan dapat dilihat pada Gambar 2.23.



Gambar 2.23 Mutasi ekspansi pengulangan. Rangkaian trinukleotida glutamin mengalami pengulangan secara serial sehingga merubah rangkaian asam amino suatu protein (US National Library of Medicine, 2008).

Pada jaringan normal, gen p16 menghasilkan p16 yang berfungsi sebagai inhibitor spesifik CDK4/6. Mutasi gen p16 menyebabkan penurunan p16. Hal ini memicu perubahan proto onkogen CDK4/6 menjadi onkogen. Kompleks ikatan CDK4/6 dengan *cyclin* D1, D2 dan atau D3 merangsang fosforilasi pRb untuk melepaskan faktor transkripsi E2F yang dibutuhkan siklus sel fase S segera bergeser ke fase G2. Peningkatan sel KNF pada fase S akibat penurunan E2F memicu peningkatan sel kanker imortal yang memicu proliferasi tak terkontrol (Li, *et al.*, 2004). Penurunan produksi p16 memicu peningkatan NF κ B berakibat peningkatan angiogenesis, invasi dan metastasis jauh (Li, Poi & Tsai, 2011).

Penelitian gen p16 dengan sampel 3 *cell line*, 3 *xenograft* dan 45 tumor primer KNF mendapatkan mutasi gen p16 pada ketiga sampel *cell line*, namun tidak didapatkan mutasi pada *xenograft* maupun tumor primer. Penelitian Ko, *et al.*, (2002) mendapatkan mutasi gen p16 pada 3 *cell line* KNF di ekson 2 dan berakibat inaktivasi gen, namun tidak mendapatkan mutasi pada 30 sampel tumor primer dan 18 jaringan nasofaring KNF rekuren. Penurunan atau tidak didapatnya p16 berakibat jumlah sel pada fase S meningkat (Chou, *et al.*, 2008). Penelitian menunjukkan bahwa inaktivasi gen p16 yang menyebabkan penurunan atau tidak didapatnya p16 pada KNF grup WHO tipe 2 dan 3 sebesar 42 (59%) dari 71 penderita serta tipe 1 sebesar 7 (54%) dari 13 penderita (Mäkitie, *et al.*, 2003). Penelitian lain menunjukkan bahwa sel KNF mempunyai sensitifitas tinggi terhadap kemoradiasi saat fase M dan G2, kurang sensitif pada fase G1 serta paling resisten di fase *late S* (Baumann, Krause & Hill, 2008). Penelitian Xiang dan Zhang (2005) melaporkan bahwa dari 90 penderita KNF *non keratinizing squamous cell* diambil secara random 23 orang, 10 (43,4%) dari 23 penderita mengalami mutasi sedangkan 2 (8,7%) penderita terjadi hipermetilasi.

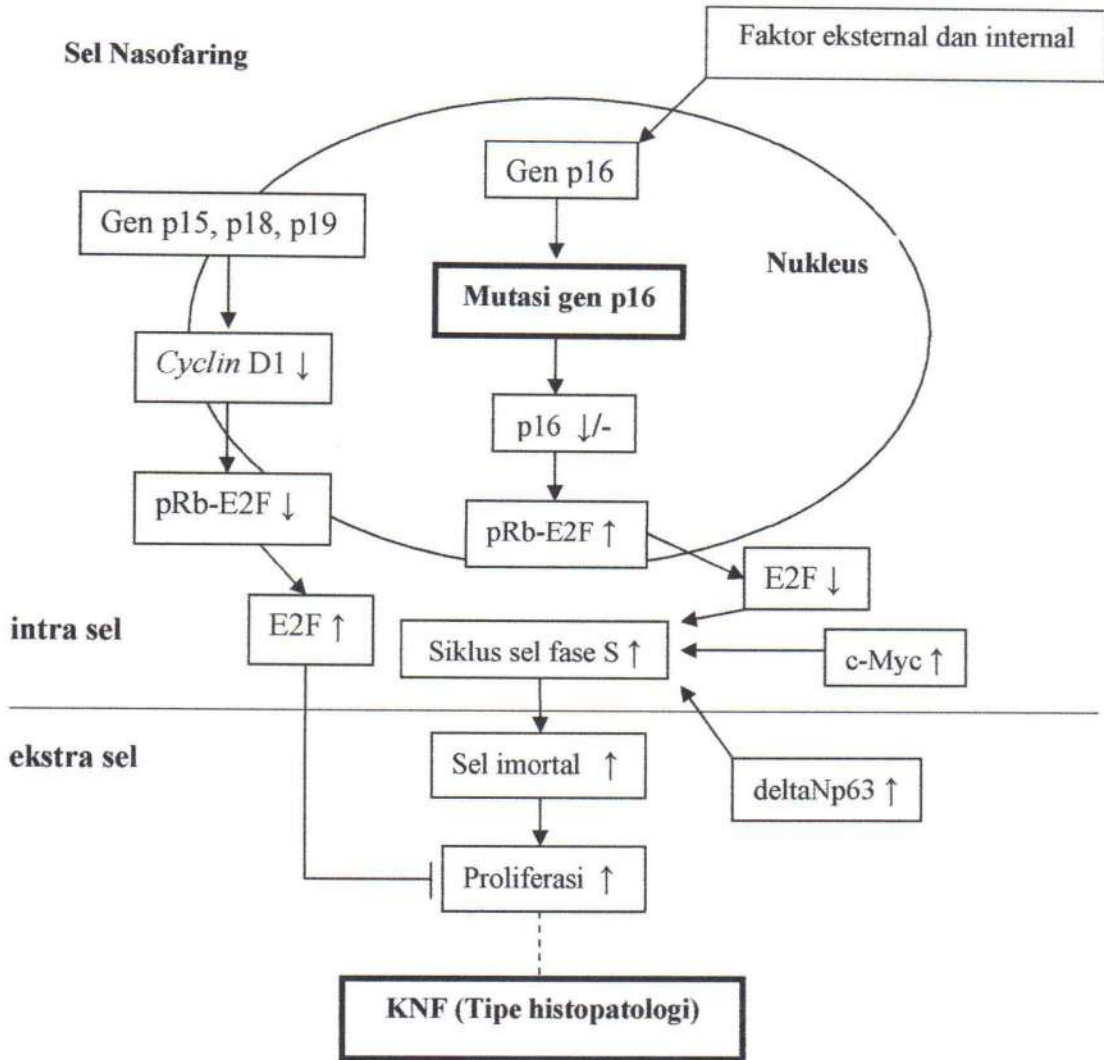
BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS PENELITIAN



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan :

→ : memicu

↓ : menurun:

⊣ : menghambat

□ : yang diteliti

↑ : meningkat

---- : berasosiasi

Gambar 3.1. Kerangka konseptual penelitian.

Penjelasan Kerangka Konseptual Penelitian

Mutasi gen p16 pada sel epitel nasofaring dapat disebabkan oleh faktor internal dan eksternal. Faktor internal berupa mutasi spontan sedangkan faktor internal berupa infeksi EBV dan lingkungan. Mutasi gen p16 di nukleus sel memicu inaktivasi gen sehingga menimbulkan penurunan p16 hingga tidak ada. Hal tersebut berakibat hambatan pemutusan ikatan pRb-E2F di nukleus sehingga terjadi penurunan E2F. Faktor transkripsi E2F berfungsi sebagai akselerator siklus sel fase S ke fase G2. Penurunan E2F di nukleus sel epitel nasofaring berakibat dalam kondisi fase S meningkat sehingga sel menjadi imortal dan proliferasi menjadi tidak terkendali. Faktor lain yang dapat menyebabkan peningkatan siklus sel pada fase S yaitu deltaNp63 dan c-Myc. Gen lain yang berperan sama dengan gen p16 meliputi gen p15, p18 dan p19, berperan juga dalam regulasi siklus sel melalui hambatan proliferasi sel yang tak terkendali melalui pengikatan *cyclin* D1. Proliferasi sel yang tak terkendali diduga berasosiasi dengan tipe histopatologi KNF.

3.2 Hipotesis Penelitian

Terdapat asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF.

BAB IV
METODE PENELITIAN



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk observasional analitik dengan rancangan *cross sectional*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

4.2.1 Tempat penelitian

a. Unit Rawat Jalan (URJ) THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya untuk mendapatkan sampel (penderita KNF), melakukan biopsi nasofaring dan penyimpanan bahan (jaringan tumor) sediaan penelitian.

b. Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga (UNAIR) Surabaya sebagai tempat untuk melakukan pemeriksaan PCR dan sekuensing jaringan tumor.

4.2.2 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober 2015 sampai data diolah dan dipresentasikan.

4.3 Bahan Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi penelitian adalah penderita curiga KNF yang datang berobat di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

4.3.2 Sampel

Sampel penelitian adalah penderita KNF dengan hasil histopatologi WHO tipe 1, 2 atau 3.

Kriteria inklusi :

1. Belum pernah mendapatkan radioterapi, kemoterapi atau kombinasi keduanya.
2. Bersedia diikutkan dalam penelitian (*informed consent*).

Kriteria eksklusi :

Tidak memenuhi syarat pemeriksaan PCR.

4.3.3 Besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini dihitung dengan menggunakan rumus: (Lameshow, *et al.*, 1990)

$$\begin{aligned} n \text{ total} &= \frac{(Z\alpha)^2 \cdot p \cdot q}{d^2} \\ &= \frac{(1,96)^2 \cdot 0,1 \cdot 0,9}{(0,13)^2} \\ &= 20,46 \text{ (digenapkan menjadi 21)} \end{aligned}$$

Keterangan :

$$\alpha = 0,05 \rightarrow Z\alpha = 1,96$$

$$p = 0,1 \text{ (Ko, et al., 2002).}$$

$$q = 1 - p = 0,9$$

d = presisi, ditetapkan sebesar 0,13

4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Penderita KNF yang berobat di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan hasil histopatologi dari Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, diambil secara *consecutive sampling* (interval 1) dengan memakai kriteria inklusi dan eksklusi.

4.4 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

4.4.1 Variabel penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel bebas mutasi gen p16 dan variabel tergantung tipe histopatologi KNF.

4.4.2 Definisi operasional

1. Mutasi gen p16 adalah perubahan urutan nukleotida rangkaian DNA gen p16 normal berupa *missense*, *nonsense*, insersi, delesi, *frameshift* maupun ekspansi pengulangan pada ekson 1 dan 2 dari pemeriksaan sekuensing jaringan tumor primer KNF. *Template* gen p16 primer *forward* GCGTGA GCTGAGGCAAGAC, *reverse* TCCAAAGCTCAGAGGCTTCATTT (Hu, 2010). Pemeriksaan sekuensing menggunakan mesin ABI PRISM 310. Penilaian mutasi gen p16 dilakukan oleh staf LPT UNAIR. Urutan nukleotida tiap ekson gen p16 dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Urutan oligonukleotida tiap ekson gen p16 (Attri, *et al.*, 2005).

Gen	Ekson	Sekuen DNA (5'-3')	Ukuran fragmen (bp)
p16	1	CGGAGAGGGGGAGAACAGAC CTGGATCGGCCTCCGACCGTAAC	189
	2	TGAGGGACCTTCCGCGGC GTCATGATGATGGGCAGCGC	307
	3	CACATCCCCGATTGAAAGAAC CAGTGAATGAATGAAAATTA	489

Penilaian gen p16 sebagai berikut:

- a. Mutasi negatif (-), bila tidak terdapat perubahan urutan nukleotida ekson 1 dan 2 gen p16 dari yang normal.
 - b. Mutasi positif (+), bila terdapat perubahan urutan nukleotida ekson 1 dan 2 gen p16 dari yang normal.
2. Tipe histopatologi KNF adalah pembagian hasil pemeriksaan jaringan KNF berdasar kriteria WHO tahun 1991 (Tabel 4.2). Pemeriksaan histopatologi dilakukan di Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya dengan menggunakan pengecatan hematoksisilin eosin cara Meyer. Pembacaan dilakukan dengan mikroskop dengan pembesaran 200-400x oleh konsultan Patologi Anatomi.

Tabel 4.2 Tipe histopatologi KNF berdasar kriteria WHO tahun 1991 (Tse, *et al.*, 2006).

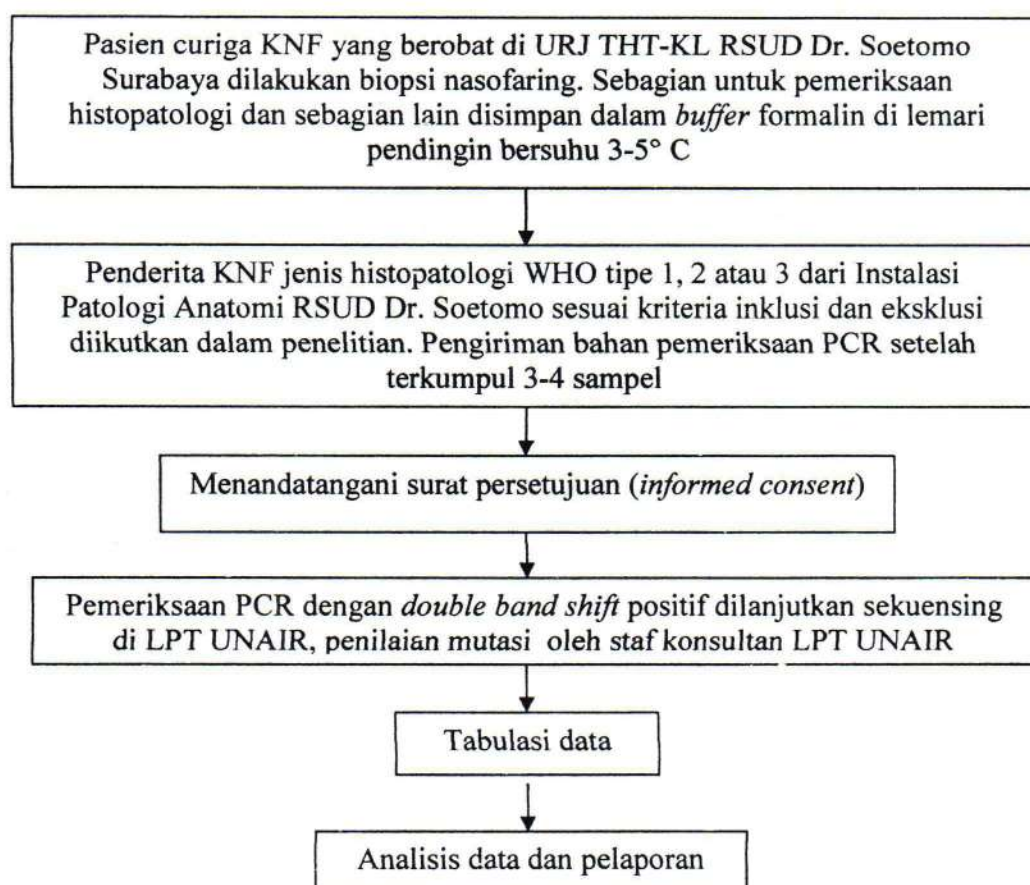
Tipe WHO	Karakteristik	Gambaran histology
Tipe 1	Diferensiasi baik, produksi keratin, dan terdapat jembatan intraseluler	<i>Keratinizing squamous carcinoma</i>
Tipe 2	Variasi diferensiasi mulai matur hingga anaplastik dan tidak produksi keratin	<i>Non keratinizing squamous carcinoma</i>
Tipe 3	Tidak produksi keratin, sedikit diferensiasi, dan terdapat berbagai macam sel (<i>clear cell</i> , sel spindle dan anaplastik)	<i>Undifferentiated carcinoma</i>

4.5 Prosedur Pelaksanaan Penelitian

1. Penderita curiga KNF di URJ THT-KL dilakukan biopsi nasofaring. Biopsi dilakukan secara *blind* oleh PPDS THT-KL. Jaringan biopsi dibagi menjadi 2 bagian. Sebagian diperiksa ke Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya sedangkan sebagian dimasukkan dalam *buffer* formalin dan disimpan di lemari pendingin bersuhu 3-5° Celsius.
2. Penderita KNF dengan hasil pemeriksaan histopatologi WHO tipe 1, 2 atau 3 dari Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo yang sesuai kriteria inklusi dan eksklusi diikutkan penelitian.
3. Menandatangani surat persetujuan (*informed consent*).
4. Mengirim sampel penelitian sekitar 3-4 sampel ditaruh dalam *box transport* ke LPT UNAIR Surabaya untuk dilakukan pemeriksaan PCR menggunakan mesin *GeneTouch* dari Bioneer.

5. Hasil PCR dengan *double band shift* positif dilakukan sekuensing menggunakan mesin ABI PRISM 310, penilaian mutasi gen p16 oleh staf konsultan LPT UNAIR.
6. Semua pemeriksaan dan hasilnya dicatat pada lembar pengumpul data serta menganalisis data.

4.6 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka operasional penelitian.

4.7 Pengolahan dan Analisis Data

1. Analisis deskriptif mutasi gen p16

Analisis mutasi gen p16 menggunakan perangkat lunak *MEGA* versi 5.1, *GENETIX TREE* versi 10.0 dan *BioEdit Alignment Editor* versi 7.2. Data pembandingan sekuen DNA berasal dari data sekuen DNA sel nasofaring normal.

2. Analisis inferensial

Data dasar disajikan dalam bentuk tabel distribusi dan frekuensi. Uji *Spearman's rho* digunakan untuk menentukan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF. Kedua variabel dinilai dengan skala nominal. Tingkat kemaknaan (α) = 0,05.

4.8 Jadwal Penelitian

Tabel 4.3 Jadwal penelitian.

No	Kegiatan/Bulan	1	2	3	4	5	6
1.	Pembuatan Usulan						
2.	Persetujuan Usulan						
3.	Pengumpulan data						
4.	Pengolahan data						
5.	Penulisan laporan						
6.	Penyajian laporan						

BAB V

HASIL PENELITIAN



BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pengumpulan sampel penelitian dilakukan di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya mulai bulan Oktober hingga Desember 2015. Sampel dikumpulkan sebanyak 21 penderita KNF yang datang berobat ke URJ THT-KL dan memenuhi kriteria penelitian (inklusi dan eksklusi). Hasil pemeriksaan histopatologi berasal dari Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Data dasar yang dicatat meliputi distribusi data penderita berdasar jenis kelamin, usia, pekerjaan, suku bangsa dan stadium. Hasil pemeriksaan PCR dan sekuensing gen p16 pada KNF dinilai oleh staf LPT UNAIR, mutasi gen p16 dinilai dalam skala nominal. Dilakukan penghitungan statistik menggunakan uji *Spearman's rho* untuk menentukan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi (WHO tipe 1, 2 dan 3) pada penderita KNF.

5.1 Data Dasar

Distribusi data penderita KNF berdasar usia dapat dilihat pada Tabel 5.1 sebagai berikut:

Tabel 5.1 Distribusi usia.

Usia (tahun)	Jumlah	%
20 - 29	1	4,76
<30 - 39	2	9,52
<40 - 49	5	23,81
<50 - 59	8	38,09
<60 - 69	4	19,06
<70 - 79	1	4,76
Total	21	100,00

Tabel 5.1 menunjukkan bahwa penderita KNF terbanyak adalah kelompok usia < 50-59 tahun yaitu 8 (38,09%) penderita, diikuti kelompok usia < 40-49 tahun 5 (23,81%) dan < 60-69 tahun sebanyak 4 (19,06%) penderita. Usia termuda 24 tahun dan tertua 71 tahun.

Distribusi penderita KNF berdasar jenis kelamin ditunjukkan pada Tabel 5.2 sebagai berikut :

Tabel 5.2 Distribusi jenis kelamin.

Jenis kelamin	Jumlah	%
Laki-laki	14	66,67
Perempuan	7	33,33
Total	21	100,00

Tabel 5.2 menunjukkan jenis kelamin terbanyak adalah laki-laki dengan jumlah 14 (66,67%) penderita sedangkan perempuan sebanyak 7 (33,33%) penderita. Perbandingan antara laki-laki dan perempuan adalah 2 : 1.

Data dasar distribusi penderita KNF berdasar suku bangsa dapat dilihat pada Tabel 5.3 adalah sebagai berikut:

Tabel 5.3 Distribusi suku bangsa.

Suku bangsa	Jumlah	%
Jawa	13	61,91
Madura	6	28,57
Dayak	2	9,52
Total	21	100,00

Tabel 5.3 menunjukkan bahwa suku bangsa pada penderita KNF terbanyak yaitu suku Jawa 13 (61,91%) , suku Madura 6 (28,57%) dan suku Dayak sebanyak 2 (9,52%) penderita.

Data dasar distribusi penderita KNF berdasar pekerjaan dapat dilihat pada Tabel 5.4 sebagai berikut:

Tabel 5.4 Distribusi jenis pekerjaan.

Pekerjaan	Jumlah	%
Petani	5	23,81
Kuli bangunan	1	4,76
Wiraswasta	6	28,57
Sopir	1	4,76
Guru	1	4,76
Ibu rumah tangga	6	28,57
PNS	1	4,76
Total	21	100,00

Tabel 5.4 menunjukkan bahwa jenis pekerjaan terbanyak adalah wiraswasta dan ibu rumah tangga yaitu masing-masing 6 (28,57%) diikuti petani sebesar 5 (23,81%) penderita.

Data dasar distribusi penderita KNF berdasarkan stadium dapat dilihat pada Tabel 5.5.

Tabel 5.5 Distribusi klasifikasi stadium.

Stadium	Jumlah	%
I	0	0
II	3	14,29
III	3	14,29
IV	15	71,42
Total	21	100,00

Tabel 5.5 menunjukkan stadium terbanyak adalah stadium IV yaitu 15 (71,42%) penderita diikuti stadium II dan III sebanyak masing-masing 3 (14,29%) penderita. Tidak didapatkan penderita KNF dengan stadium I.

Data dasar distribusi penderita KNF berdasarkan tipe histopatologi dapat dilihat pada Tabel 5.6.

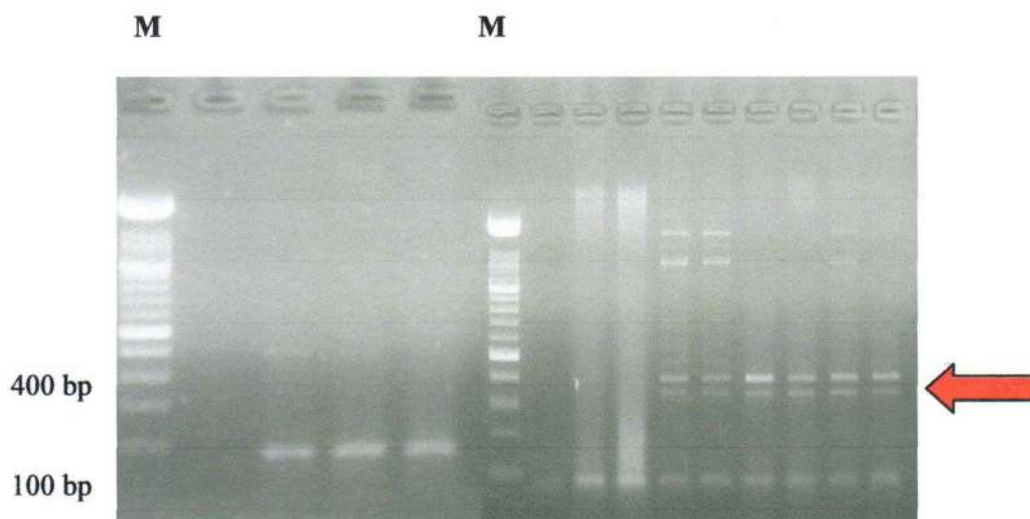
Tabel 5.6 Distribusi tipe histopatologi.

Tipe histopatologi	Jumlah	%
WHO tipe 1	2	9,52
WHO tipe 2	1	4,76
WHO tipe 3	18	85,72
Total	21	100,00

Tabel 5.6 menunjukkan bahwa tipe histopatologi terbanyak adalah WHO tipe 3 yaitu 18 (85,72%) diikuti tipe 1 sebanyak 2 (9,52%) penderita.

5.2 Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi KNF

Hasil pemeriksaan PCR terhadap 21 sampel penderita KNF didapatkan gambaran *double band shift* pada 14 (66,67%) sampel. Digunakan 100 *base pair* (bp) nukleotida sebagai marker. Fokus dilakukan sekuensing yaitu pada ekson 1 dan 2 gen p16, ekson 1 berukuran sekitar 200 bp sedangkan ekson 2 sekitar 200-300 bp (Gambar 5.1). Pemeriksaan PCR mendapatkan 14 sampel dengan gambaran *double band shift* berada di ukuran 400 bp atau merupakan gabungan dari ekson 1 dan 2 gen p16. Empat belas sampel tersebut dilakukan sekuensing untuk menentukan ada atau tidak mutasi.



Gambar 5.1 Pemeriksaan PCR pada jaringan tumor dengan menggunakan marker berukuran 100 bp. Tanda panah menunjukkan *double band shift* dengan ukuran sekitar 400 bp yang merupakan ekson 1 dan 2 gen p16.

Tabel 5.7 Distribusi pemeriksaan *polymerase chain reaction*.

<i>Double band shift</i>	Jumlah	%
Negatif	7	33,33
Positif	14	66,67
Total	21	100,00

Tabel 5.7 menunjukkan bahwa pemeriksaan PCR dengan *double band shift* positif sebanyak 14 (66,67%) penderita sedangkan yang negatif 7 (33,33%) penderita.

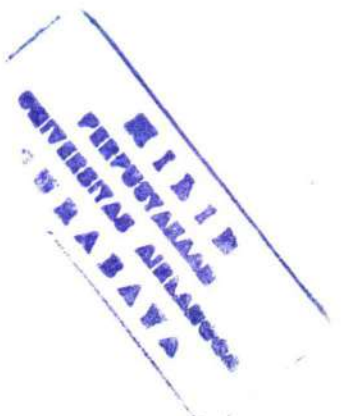
Mutasi gen p16 dibanding dengan tipe histopatologi pada penderita KNF, dapat dilihat pada Tabel 5.8 sebagai berikut:

Tabel 5.8 Hasil pemeriksaan mutasi gen p16 pada berbagai tipe histopatologi.

Mutasi gen p16	Tipe histopatologi			Jumlah	%
	1	2	3		
Negatif	2	1	16	19	90,48
Positif	0	0	2	2	9,52
Total	2	1	18	21	100,00

Tabel 5.8 menunjukkan hasil pemeriksaan mutasi gen p16 (sekuensing) pada KNF dengan histopatologi WHO tipe 1 dan 2 tidak didapatkan mutasi atau negatif. Pada KNF WHO tipe 3 didapatkan 2 (9,52%) dari 21 sampel mengalami mutasi gen p16. Hasil sekuensing ditunjukkan pada Gambar 5.2.

BAB VI
PEMBAHASAN



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan rancang bangun *cross sectional* karena pengukuran variabel dilakukan dalam satu kali pada waktu tertentu. Studi *cross sectional* dilakukan dengan cara mengamati subjek satu kali saja pada satu titik waktu dan tidak dilakukan tindak lanjut (Mann, 2003). Rancang bangun *cross sectional* sering digunakan pada studi klinis maupun lapangan serta bisa digunakan untuk penelitian deskriptif maupun analitik. Penelitian ini bersifat analitik karena peneliti berupaya mencari asosiasi antar variabel dengan melakukan analisis terhadap data yang telah terkumpul. Hipotesis dapat dibuat pada penelitian analitik dan kemudian dilakukan uji hipotesis (Alatas, dkk, 2002).

Kelebihan disain *cross sectional* antara lain memungkinkan pengambilan populasi dari masyarakat umum, sehingga generalisasinya cukup memadai, murah, mudah, hasilnya cepat didapat, dapat dipakai untuk meneliti banyak variabel sekaligus dan sampel penelitian jarang terancam *drop out*. Hasil penelitian dapat dipakai sebagai dasar untuk penelitian selanjutnya yang bersifat lebih konklusif. Kekurangan dari disain ini adalah tidak dapat menggambarkan perjalanan suatu penyakit, insidens maupun prognosis serta dibutuhkan subjek yang cukup besar terutama bila variabel yang diteliti banyak dan tidak praktis untuk meneliti kasus yang sangat jarang (Ghazali, dkk, 2002).

Data yang diperoleh dalam penelitian ini selanjutnya dianalisis secara statistik. Uji *Spearman's rho* digunakan untuk menentukan asosiasi mutasi gen

p16 dengan tipe histopatologi KNF WHO tipe 1, 2 dan 3. Tingkat kemaknaan (α) = 0,05.

6.1 Data Dasar

Hasil penelitian (Tabel 5.1) menunjukkan bahwa distribusi usia KNF terbanyak adalah pada kelompok usia < 50-59 tahun yaitu 8 (38,10%) penderita, diikuti kelompok usia < 40-49 tahun yaitu 5 (23,81%) penderita dan < 60-69 tahun sebanyak 4 (19,06%) penderita. Usia termuda 24 tahun dan tertua 71 tahun. Penelitian sebelumnya didapatkan hasil sama, dari 40 penderita KNF didapatkan insidens terbanyak pada kelompok usia 50-59 tahun yaitu 16 (40%), diikuti kelompok usia 40-49 tahun 12 (30%) kemudian 30-39 tahun dan 60-69 tahun masing-masing sebanyak 5 (12,50%) penderita (Amelia, 2015).

Penelitian dari sentra lain di RSUP Dr. Kariadi Semarang, penderita KNF terbanyak dari 128 orang yaitu kelompok usia 40-49 tahun sebesar 32,80% diikuti kelompok 50-59 tahun 31,30% kemudian 30-39 tahun sebanyak 10,90% (Arditawati, 2011). Insidens KNF terbanyak dijumpai pada usia produktif yaitu 30-59 tahun (sekitar 80%), dengan puncak usia antara 40-49 tahun dan insidens tertinggi adalah umur 40-60 tahun (Mulyarjo, 2002; Kentjono, 2010). Parkin, *et al.*, (2005) melaporkan hal yang sama bahwa insidens KNF meningkat setelah usia 30 tahun dan mencapai puncak pada usia 40-60 tahun kemudian menurun setelahnya.

Karsinoma nasofaring jarang pada anak yaitu sekitar 1-5% dari seluruh kanker. Perkembangan KNF dilaporkan dapat dimulai rata-rata sejak usia 13 tahun. Progresivitas KNF diketahui mempunyai asosiasi dengan inaktivasi gen

p14, p15, p16, mutasi gen p53 dan peningkatan *cadherin* (Vianna, *et al.*, 2012). Sel KNF dapat berasal dari sel normal yang mengalami transformasi menjadi ganas, karena mutasi spontan atau induksi karsinogen. Transformasi sel normal menjadi kanker diperlukan waktu induksi yang lama yaitu 15-30 tahun (Sukardja, 2000). Pada usia produktif, paparan bahan karsinogenik atau polusi yang lebih banyak, semakin berkembangnya infeksi laten EBV dan penurunan faktor imunitas diduga sebagai predisposisi KNF. Hal ini yang mungkin menyebabkan insidens tinggi didapati pada usia 40-60 tahun (Zeng & Zeng, 2010).

Penderita KNF berdasarkan jenis kelamin (Tabel 5.2) terbanyak adalah laki-laki berjumlah 14 (66,67%) dan perempuan sebanyak 7 (33,33%) orang. Perbandingan antara laki-laki dan perempuan adalah 2 : 1. Penelitian sebelumnya didapatkan laki-laki sebanyak 26 (65,00%) dan perempuan 14 (35,00%) penderita dengan perbandingan antara laki-laki dan perempuan adalah 1,86:1 (Amelia, 2015). Penelitian sentra lain di RSUP Dr. Kariadi Semarang mendapatkan hasil sama yaitu 2:1 (Arditawati, 2011). Penelitian Roezin (1995) masih relevan hingga sekarang bahwa perbandingan penderita KNF laki-laki dan perempuan hampir sama diseluruh Indonesia yaitu 2-3:1. Penelitian di Amerika Serikat mendapatkan hasil 3:1 (Thompson, 2007).

Tingginya insidens pada laki-laki mungkin disebabkan perbedaan kebiasaan hidup dan pekerjaan sehingga laki-laki lebih lebih sering kontak dengan karsinogen penyebab KNF. Kebiasaan hidup seperti merokok, paparan uap, asap debu dan gas kimia di tempat kerja meningkatkan risiko KNF 2-6 kali. Paparan formaldehid di tempat kerja meningkatkan risiko KNF 2-4 kali. Zat tersebut dimetabolisme oleh enzim tubuh menjadi *ultimate-carcinogen* sehingga dapat

menyebabkan mutasi genetik. Penggunaan kayu bakar, paparan panas industri dan produk pembakaran juga meningkatkan risiko KNF 2 kali lipat (Chang & Adami, 2006).

Hasil penelitian didapatkan distribusi penderita KNF berdasarkan suku bangsa (Tabel 5.3) terbanyak adalah suku Jawa yaitu 13 (61,91%) orang, Madura 6 (28,57%) dan Dayak 2 (9,52%) orang. Penelitian sebelumnya dari 40 penderita KNF didapatkan suku terbanyak adalah suku Jawa yaitu 35 (87,50%) orang, Madura 2 (5,00%), Flores 1 (2,50%), Dayak 1 (2,50%) dan Papua 1 (2,50%) orang (Amelia, 2015). Penelitian pada 67 penderita KNF di Inggris didapatkan hasil paling banyak dari etnis kulit putih 50,7%, diikuti Asia Timur 25,4% dan sisanya adalah kulit hitam 20,9% serta Afrika Utara 3,0% (Robinson, *et al.*, 2013).

Karsinoma nasofaring merupakan penyakit yang khas dari sisi etnis dan geografis karena terdapat di daerah tertentu dengan prevalensi tinggi seperti di Cina Selatan, orang Eskimo di daerah Artik, serta di Asia Tenggara. Insidens KNF tetap tinggi di kalangan keturunan penduduk Cina Selatan yang tinggal di negara lain. Indonesia termasuk tingkat kekerapan menengah. Hal tersebut dikombinasi dengan pemicu dari lingkungan dan infeksi EBV (Chatarina, 2010).

Penderita KNF banyak dari suku Jawa disebabkan tempat tinggal terbanyak dari kota Surabaya dan sekitarnya sebagai lokasi penelitian. Penelitian genetika mendapatkan alel gen HLA yang potensial sebagai penyebab kerentanan timbulnya KNF. Penelitian di Medan mendapatkan alel gen HLA-DRB*08 sebagai predisposisi insidens KNF pada suku Batak (Munir, 2009). Studi imunogenik di Jakarta tahun 1997 mendapatkan HLA-A24 dan HLA-B63 yang diduga sebagai faktor penyebab KNF bagi orang Indonesia asli (Kentjono, 2010).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa distribusi penderita KNF berdasarkan pekerjaan (Tabel 5.4) terbanyak adalah wiraswasta dan ibu rumah tangga yaitu masing-masing 6 penderita (28,57%) diikuti petani sebesar 5 (23,81%) penderita. Penelitian di India dari 103 penderita KNF didapatkan 35 (34%) bekerja sebagai buruh, 23 (22,3%) ibu rumah tangga, 18 (17,5%) pelajar, 12 (11,6%) petani dan 15 (14,6%) berprofesi lain (Krishna, *et al.*, 2006). Guo, *et al.*, (2009) mendapatkan faktor risiko dalam pekerjaan yang menjadi predisposisi KNF meliputi paparan terhadap asap kayu bakar lebih dari 10 tahun dan paparan bahan pelarut kurang dari 10 tahun.

Paparan partikel karsinogenik dengan ukuran sedang (5-10 μm) mudah diserap oleh mukosa nasofaring. Bahan karsinogenik dapat masuk ke dalam tubuh melalui proses hirupan udara atau lewat oral. Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa pekerja yang terpapar debu kayu pada periode dan dosis tertentu mengalami peningkatan risiko terkena KNF namun rasio paparan pekerja tidak dapat ditentukan karena tergantung oleh kekerapan dan area yang endemik (Ma & Cao, 2010). Penelitian di Malaysia menunjukkan bahwa paparan bahan berbahaya (radiasi ion, logam berat, asap, debu kayu dan bahan kimia volatil) di lingkungan kerja berhubungan signifikan sebagai faktor risiko KNF (Hashim, *et al.*, 2012). Paparan sinar ultra violet matahari juga dapat meningkatkan insidens kanker (Loewe, 2008).

Jenis pekerjaan wiraswasta dan ibu rumah tangga didapatkan terbanyak menderita KNF. Paparan ultra violet, asap kendaraan bermotor dan polusi udara dalam jangka waktu lama dimungkinkan meningkatkan risiko KNF. Pekerjaan wiraswasta seperti tukang las dan pedagang kaki lima yang mempunyai aktivitas

di luar rumah lebih lama dimungkinkan meningkatkan risiko menderita KNF. Aktivitas dalam rumah tangga yang sering mengalami paparan asap pembakaran gas dan bahan kimia seperti pemutih serta pembersih lantai meningkatkan risiko KNF. Kekurangan diet buah, sayuran, daging merah dan makanan kurang iodium dalam rumah tangga juga berisiko menderita KNF (Hashim, *et al.*, 2012). Risiko KNF meningkat pada petani dapat disebabkan paparan ultra violet, kontak dengan pestisida, bahan kimia bersifat asam maupun basa dan asap pembakaran kayu atau tanaman. Penelitian menunjukkan risiko paparan selama 10-20 tahun memiliki hubungan yang bermakna dengan kejadian KNF dan dihitung sebagai efek masa laten (Li, *et al.*, 2005).

Distribusi kelompok stadium (Tabel 5.5) didapatkan bahwa kelompok stadium terbanyak adalah stadium IV yaitu sebesar 15 (71,42%) penderita dan diikuti stadium II dan III masing-masing 3 (14,29%) penderita sedangkan stadium I tidak didapatkan. Kelompok stadium KNF yang terbanyak didapatkan di Indonesia adalah stadium IV. Penelitian sebelumnya pada 40 penderita KNF di senter sama mendapatkan stadium IV 21 (52,50%), stadium III 16 (40%), stadium II (5%) dan stadium I sebanyak 1 (2,50%) penderita (Amelia, 2015). Penelitian di Inggris juga didapatkan stadium IV sebesar 52,20%, stadium III 31,30% dan stadium II 14,90% sedangkan stadium I tidak didapatkan (Robinson, *et al.*, 2013).

Penderita KNF sering datang dalam keadaan lanjut. Faktor penyebabnya meliputi keterlambatan dalam mengakses pengobatan, pengetahuan tentang KNF yang rendah, jauhnya tempat penanganan dan tingkat sosio ekonomi (Tulalamba & Javilisri, 2012). Penelitian di India menunjukkan 68 (66,0%) dari 103 penderita

KNF mempunyai status sosio ekonomi rendah dan 91 (88,4%) berasal dari pedesaan (Krishna, *et al.*, 2006). Penelitian di Taiwan menunjukkan bahwa faktor sosio ekonomi mempunyai hubungan signifikan dengan keterlambatan terapi KNF sedangkan tempat tinggal atau asal penderita tidak ada hubungan signifikan dengan keterlambatan terapi (Chen, *et al.*, 2014). Penelitian KNF di Indonesia menunjukkan bahwa penderita datang dalam kondisi lanjut akibat kurangnya pengetahuan petugas kesehatan di tingkat pelayanan primer dan keterlambatan dalam rujukan ke senter yang lebih tinggi (Wildeman, *et al.*, 2013).

Data dasar penelitian (faktor eksternal) tidak perlu dilakukan uji homogenitas oleh karena tidak mempengaruhi variabel yang diteliti.

6.2 Mutasi Gen p16 pada KNF

Penelitian ini mendapatkan mutasi pada 2 sampel KNF meliputi seorang penderita laki-laki stadium III dan seorang penderita perempuan dengan stadium IV. Sampel pertama didapatkan mutasi poin di 228 bp. Kodon AAA untuk kode asam amino lisin berganti menjadi ATA untuk kode isoleusin. Terdapat perubahan nukleotida adenin menjadi timin. Pada sampel kedua, didapatkan mutasi poin di 299 bp yaitu kodon AAT untuk asam amino asparagin diganti menjadi kodon CAT untuk asam amino histidin. Terdapat perubahan nukleotida adenin menjadi sitosin. Semua mutasi terjadi antara 200 hingga 300 bp yang berarti berada di ekson 2.

Pada karsinoma nasofaring, inaktivasi gen p16 dapat disebabkan oleh beberapa faktor meliputi delesi, mutasi dan hipermetilasi. Penelitian menunjukkan bahwa mekanisme hipermetilasi merupakan penyebab tersering dalam deregulasi

p16 pada KNF diikuti delesi kemudian mutasi (Lo, Huang & Lau, 1995). Insidens mutasi gen p16 sendiri pada KNF diperkirakan sebesar 5% (Lin, *et al.*, 2014). Penelitian menunjukkan bahwa mutasi gen p16 sering didapatkan di *cell line* namun sulit ditemukan pada jaringan tumor KNF. Hal ini disebabkan *cell line* merupakan kultur sel KNF yang selalu dijaga kesterilannya dan bersifat imortal sehingga semua perubahan genetik dapat ditemukan sedangkan jaringan primer mempunyai sifat imortal (Lo, Huang & Lau, 1995; Ko, *et al.*, 2002).

Mutasi gen p16 sering ditemukan pada berbagai jenis kanker diikuti mutasi gen p53. Insidensnya pada kanker payudara sekitar 20%, karsinoma paru *non small cell* 65%, karsinoma sel skuamosa kepala leher 50-70%, melanoma 60%, leukemia 60%, kanker esofagus 70%, *multiple myeloma* 60% dan karsinoma pankreas $\geq 85\%$. Mutasi gen p53 pada KNF diperkirakan sebesar 0-8% (Bruce, *et al.*, 2015). Penelitian Mäkitie, *et al.*, (2003) menunjukkan bahwa mutasi gen p16 tersering berupa mutasi poin atau *nonsense* kemudian diikuti delesi. Hal sama dilaporkan pada karsinoma duktus pankreas dari 25 sampel didapatkan mutasi 4 (16%) berupa mutasi poin (Attri, *et al.*, 2005).

Tempat mutasi sering didapatkan di ekson 2 dan jarang ekson 1. Penelitian pada 3 *cell line* KNF menunjukkan bahwa mutasi gen p16 didapatkan di semua *cell line* dan berada di ekson 2 (Ko, *et al.*, 2002). Penelitian dilakukan di Cina pada 90 penderita KNF tipe histopatologi *non keratinizing squamous cell*. Diambil 23 sampel secara random dan didapatkan hasil 10 (40,9%) penderita mengalami mutasi pada ekson 2 gen p16 serta 2 (8,7%) mengalami hipermetilasi pada ekson 1 (Xiang & Zhang, 2005). Penelitian karsinoma laring mendapatkan hasil bahwa 3 (5%) dari 64 penderita mengalami mutasi gen p16, 2 kasus

didapatkan mutasi poin di ekson 1 dan 2 sedangkan 1 kasus lain hanya di ekson 2 (Bazan, *et al.*, 2002). Hasil berbeda, penelitian tentang melanoma mendapatkan bahwa 2 (5,13%) dari 39 tumor primer mengalami mutasi poin gen p16 di ekson 1 (Soto, *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai gen p16 pada KNF sangat jarang dilakukan. Penelitian yang sudah dilakukan yaitu penelitian tentang perubahan gen p16 pada KNF (Lo, Huang & Lau, 1995), skrining mutasi gen p16 (Ko, *et al.*, 2002) dan terakhir penelitian terapi gen p16 pada KNF (Lee, *et al.*, 2003). Penelitian terbaru di Malaysia merupakan studi pendahuluan tentang macam gen yang mengalami penurunan regulasi pada KNF mendapatkan hasil bahwa gen p16 merupakan salah satu gen yang mengalami hal tersebut (Sim, Toh & Tiong, 2008). Penelitian yang banyak dilakukan berupa ekspresi p16 dan konsekuensinya pada KNF. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa mutasi gen p16 pada KNF sering berupa mutasi poin dan berada di ekson 2. Mutasi poin sering ditemukan karena hal tersebut mudah terjadi namun penjelasan mengenai sering berada di ekson 2 belum diketahui.

6.3 Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi KNF

Tabel 5.8 menunjukkan hasil pemeriksaan mutasi gen p16 pada penderita KNF tipe histopatologi WHO tipe 1, 2 dan 3. Didapatkan mutasi negatif pada 19 (90,48%) dari 21 sampel sedangkan mutasi positif didapatkan pada 2 (9,52%) sampel dan semuanya adalah WHO tipe 3. Tidak ditemukan mutasi pada sampel penderita KNF dengan WHO tipe 1 dan 2. Hasil analisis statistik asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF digunakan uji *Spearman's*

didapatkan nilai $p = 0,568$ dengan koefisien korelasi $(r) = -0,132$. Analisis statistik asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF tidak bermakna ($p > 0,05$). Hipotesis penelitian tidak terbukti.

Penelitian serupa belum pernah dilakukan. Penelitian gen p16 mengenai ekspresi p16 lebih banyak dilakukan dibanding penelitian mutasi gen p16. Penelitian Wang, *et al.*, (1999) tentang gen p16 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ekspresi p16 pada epitel nasofaring yang mengalami inflamasi kronik dengan KNF, tipe histopatologi *poor differentiated* dengan *undifferentiated* serta pada KNF stadium I-II dengan stadium IV ($p < 0,01$). Penyebab perbedaan ekspresi p16 pada KNF tipe *poor differentiated* dengan *undifferentiated* tidak diteliti lebih lanjut. Wang, *et al.* merekomendasikan gen p16 sebagai alternatif indikator prognosis KNF.

Penelitian Xiang dan Zhang (2005) di Cina pada 23 penderita KNF *non keratinizing squamous cell* didapatkan hubungan signifikan penurunan ekspresi p16 terhadap kejadian metastasis jauh ($p < 0,05$). Penurunan ekspresi p16 disebabkan oleh inaktivasi gen p16. Hasil penelitian membuktikan bahwa inaktivasi gen p16 akibat mutasi mempunyai peran penting dalam kejadian metastasis jauh pada KNF dengan tipe histopatologi *non keratinizing squamous cell* sedangkan asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi didapatkan tidak bermakna ($p > 0,05$).

Penurunan atau tidak didapatkan ekspresi p16 pada KNF dibuktikan dapat sebagai indikator prognosis. Makitie, *et al.*, (2003) melakukan analisis multivarian menunjukkan bahwa penurunan atau tidak didapatkan ekspresi p16 pada KNF dihubungkan dengan usia, penurunan berat badan dan stadium mempunyai

korelasi signifikan terhadap angka kelangsungan hidup ($p = 0,02$). Penurunan ekspresi p16 banyak disebabkan oleh hipermetilasi gen p16 dan bukan mutasi. Hasil penelitian tidak didapatkan hubungan signifikan ($p = 0,77$) perbedaan penurunan ekspresi p16 pada grup WHO tipe 2+3 dengan grup WHO tipe 1.

Penelitian di Malaysia mengidentifikasi 10 gen dengan PCR pada seorang normal, seorang penderita KNF WHO tipe 2 dan seorang penderita KNF WHO tipe 3. Penelitian ini mendapatkan hasil bahwa terdapat penurunan regulasi 10 gen yang diperiksa, salah satunya gen p16, antara orang normal dibanding penderita KNF WHO tipe 2 atau 3 (Sim, Toh & Tiong, 2008). Penelitian lain melaporkan bahwa terdapat korelasi signifikan ($p < 0,001$) antara penderita KNF etnis Asia Timur dengan tipe histopatologi WHO tipe 3. Hal tersebut menguatkan hubungan antara KNF dengan etnis dan tipe histopatologi tertentu (Robinson, *et al.*, 2013).

Penelitian Hwang, *et al.*, (2002) tentang ekspresi p16 dan *cyclin D1* dilakukan pada 65 penderita KNF pasca pemberian radioterapi dan diikuti selama 6 tahun. Hasil penelitian didapatkan bahwa 42 (65%) penderita tidak didapatkan ekspresi p16. Tidak terdapat hubungan signifikan ekspresi p16 dengan tipe histopatologi ($p = 0,816$) namun didapatkan hubungan signifikan ekspresi p16 dengan kejadian rekurensi lokal ($p = 0,047$), sedangkan ekspresi p16 terhadap metastasis jauh, angka kelangsungan hidup dan stadium juga tidak didapatkan hubungan signifikan ($p > 0,05$). Hwang, *et al.* merekomendasikan ekspresi p16 sebagai indikator prediksi rekurensi regional dan bila penelitian dilanjutkan dengan sampel lebih besar maka diharapkan dapat menghasilkan strategi terapi lebih baik.

Pengaruh ekspresi p16 dan p53 dibandingkan pada penelitian di Meksiko dengan hasil bahwa terdapat asosiasi signifikan antara penurunan ekspresi p16 pada KNF dengan kejadian metastasis ($p = 0,03$) dan kejadian timbulnya rekurensi ($p = 0,006$). Terdapat hubungan signifikan antara WHO tipe 2/3 dengan angka kelangsungan hidup yang rendah ($p = 0,05$). Penurunan ekspresi p53 tidak didapatkan asosiasi signifikan terhadap kejadian metastasis maupun rekurensi. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan signifikan antara ekspresi p16 atau p53 dengan angka kelangsungan hidup (Perez, *et al.*, 2014).

Mutasi gen p16 dalam beberapa penelitian pada beberapa jenis karsinoma selain KNF memberikan hasil yang hampir sama. Penelitian karsinoma sel skuamosa orofaring menunjukkan hasil bahwa ekspresi p16 mempunyai hubungan signifikan dengan rekurensi lokal ($p = 0,013$) dan angka kelangsungan hidup ($p = 0,021$). Penelitian ini merekomendasikan bahwa status p16 dapat digunakan sebagai salah satu indikator prognosis dan perencanaan terapi (Weinberger, *et al.*, 2004). Penelitian Attri, *et al.*, (2005) pada karsinoma duktus pankreas melaporkan bahwa mutasi, delesi dan hipermetilasi gen p16 tidak terdapat hubungan signifikan dengan usia, stadium dan diferensiasi histologi ($p > 0,05$).

Penelusuran literatur menunjukkan bahwa mutasi gen p16 mempengaruhi diferensiasi sel. Pengaruh mutasi gen p16 pada KNF sudah dimulai sejak masa lesi pre invasif *low grade*. Infeksi EBV terhadap diferensiasi sel dimulai sejak masa lesi pre invasif *high grade*. Kombinasi pengaruh mutasi gen p16 dan infeksi EBV semakin meningkatkan diferensiasi sel menuju KNF (Hu, 2010). Hal ini dibuktikan oleh penelitian Xiang dan Zhang (2005) bahwa mutasi gen p16 banyak didapatkan pada KNF tipe non keratinizing yang mempunyai keterkaitan dengan

EBV. Pemeriksaan ekspresi p16 diperlukan sebagai *cross check* pengaruh mutasi gen p16. Penelitian Mäkitie, *et al.*, (2003) didapatkan fakta bahwa penurunan ekspresi p16 akibat inaktivasi gen p16 tidak terdapat hubungan signifikan ($p > 0,05$) pada KNF grup *keratinizing* dan *non keratinizing*.

Penelitian yang dilakukan tidak berhasil membuktikan hipotesis penelitian. Pemeriksaan PCR (Tabel 5.7) didapatkan gambaran *double band shift* 14 (66,67%) dari 21 sampel yang menandakan kecurigaan terdapat mutasi gen p16. Hasil sekuensing didapatkan hanya 2 (14,29%) dari 14 sampel yang terjadi mutasi. Dimungkinkan 12 sampel dengan *double band shift* negatif disebabkan oleh inaktivasi gen p16 bentuk lain yaitu hipermetilasi. Fakta tersebut menunjukkan bahwa insidens mutasi gen p16 pada KNF memang sangat jarang namun berbeda dengan hasil penelitian Bruce, *et al.*, (2015) didapatkan insidens KNF sebesar 5%. Hipermetilasi diketahui menjadi penyebab inaktivasi gen p16 tersering (Lo, Chung & To, 2013).

Kedua sampel dengan mutasi positif tidak dilakukan pemeriksaan ekspresi p16. Penurunan ekspresi p16 merupakan manifestasi inaktivasi gen p16 yang salah satunya akibat mutasi. Hasil penelitian tidak bisa menunjukkan mutasi gen p16 yang diikuti penurunan ekspresi p16. Dimungkinkan mutasi terjadi tanpa diikuti penurunan ekspresi p16. Hal tersebut menunjukkan terdapat faktor lain yang dapat menyebabkan proliferasi sel tak terkendali (Agarwal, *et al.*, 2012). Penelitian Mäkitie, *et al.*, (2003) didapatkan inaktivasi gen p16 menyebabkan penurunan ekspresi p16 namun tidak terdapat hubungan signifikan penurunan ekspresi p16 pada KNF grup *keratinizing* dengan *non keratinizing*. Diketahui protein pRb dan *cyclin D1* dapat mempengaruhi ekspresi p16.

Didapatkan kedua sampel mutasi pada KNF WHO tipe 3 dan stadium lanjut. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat keterkaitan mutasi gen p16 dengan EBV. Karsinoma nasofaring tipe *undifferentiated carcinoma* diketahui hampir 100% didapatkan infeksi EBV (Hutajulu, *et al.*, 2011). Virus Epstein-Barr dan produknya semakin meningkatkan pengaruh mutasi gen p16 dalam proses diferensiasi dan proliferasi sel. Transformasi menjadi sel kanker semakin cepat dan proliferasi sel semakin bertambah sehingga stadium semakin meningkat. Penelitian Wang, *et al.*, (1999) dan Mäkitie, *et al.*, (2003) didapatkan penurunan ekspresi akibat inaktivasi gen p16 mempunyai hubungan signifikan dengan stadium awal dan lanjut.

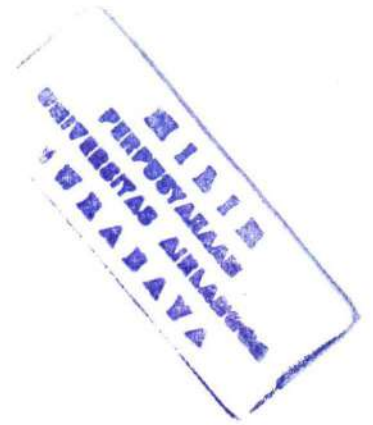
Mutasi atau inaktivasi gen p16 dapat dipakai untuk alternatif indikator prognosis KNF melalui ekspresi p16. Hal tersebut dinilai berdasarkan hubungannya dengan kejadian metastasis jauh, rekurensi regional maupun angka kelangsungan hidup. Ekspresi p16 juga dapat dijadikan alternatif indikator dalam penentuan strategi terapi namun masih memerlukan jumlah sampel lebih besar, studi kohort dan penelitian multi senter. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa inaktivasi gen p16 dan penurunan regulasi ekspresi p16 pada KNF hanya mempunyai hubungan dengan tipe histopatologi tertentu, terutama WHO tipe 3 dan pada daerah endemik.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian yang dilakukan tidak memeriksa ekspresi p16 di tingkat jaringan sebagai *cross check* terhadap inaktivasi gen p16 akibat mutasi sehingga tidak bisa mendapatkan kesesuaian gambaran mutasi gen p16 dengan ekspresi

p16. Penelitian ini juga tidak mengevaluasi penyebab inaktivasi gen p16 yang lain meliputi *loss of heterozygosity* kromosom 9p21 dan hipermetilasi. Penelitian ini juga tidak memeriksa faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil penelitian meliputi gen lain yang mempunyai kesamaan fungsi, inhibitor alami gen p16 maupun protein lain seperti NF κ B, *survivin* dan pRb.

BAB VII
KESIMPULAN DAN SARAN



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Tidak terdapat asosiasi antara mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi karsinoma nasofaring.

7.2 Saran

Mutasi gen p16 tidak dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif (indikator) prediksi respons terapi KNF. Diperlukan pemeriksaan ekspresi p16 untuk mengetahui kesesuaian hasil antara mutasi yang menyebabkan inaktivasi gen p16 dengan produk fungsionalnya.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Adham M, Kurniawan AN, Muhtadi AI, Roezin A, Hermani B, Gondhowiardjo S, *et al.*, 2012. Nasopharyngeal carcinoma in Indonesia: epidemiology, incidence, signs and symptoms at presentation. *Chinese J Cancer*, 31(4): 185-96.
- Agarwal P, Kabir FML, DeInnocentes P, Bird RC, 2012. Tumor suppressor gene p16/ink4a/cdkn2a and its role in cell cycle exit, differentiation, and determination of cell fate. In: Cheng Y, ed. *Tumor suppressor gene*. Shanghai: Intech China, pp. 1-17.
- Amelia FI, 2015. Hubungan ekspresi β -catenin dengan stadium pada karsinoma nasofaring. Dalam: Karya akhir untuk memperoleh ijazah keahlian ilmu kesehatan telinga hidung tenggorok bedah kepala dan leher, Departemen/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNAIR/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
- Arditawati Y, Prasetyo A, 2011. Analisis hubungan antara faktor risiko dengan tipe histopatologi pada karsinoma nasofaring. Program pendidikan sarjana kedokteran. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro-RSUP Dr. Kariadi Semarang, hal.1-16.
- Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J, 2005. Alterations of tumor suppressor gene p16^{ink4a} in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterology*, 5: 22-31.
- Baba Y, Tsukuda M, Mochimatsu I, Furukawa S, Kagata H, Satake K, *et al.*, 2001. Reduced expression of p16 and p27 proteins in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 25: 414-9.
- Baumann M, Krause M, Hill R, 2008. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *NCBI*, 8: 545-53.
- Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Casla MTS, Maestro ML, Corsale S, *et al.*, 2002. Prognostic significance of p16^{ink4a} alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *J Cell Physiol*, 192: 286-93.
- Bhatt AN, Mathur R, Farooque A, Verma A, Dwarakanath BS, 2010. Cancer biomarkers – current perspectives. *Indian J Med Res*, 132: 129-49.
- Brennan B, 2006. Nasopharyngeal carcinoma. *Orphanet J Rare Dis*, 1: 23-9.

- Brown T, 2012. Mutagenesis and DNA repair. Available from: <http://www.atdbio.com/content/15/Mutagenesis-and-DNA-repair> Accessed September 9, 2014.
- Bruce JP, Yip K, Bratman SV, Ito E, Liu FF, 2015. Nasopharyngeal cancer: molecular landscape. *J Clin Oncol*, 33:1-10.
- Chan ATC, Teo PML, Johnson PJ, 2002. Nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol*, 13: 1007-15.
- Chan M, Bartlett E, Sahgal A, Chan S, Yu E, 2012. Imaging of nasopharyngeal carcinoma. In: Chen SS, ed. *Carcinogenesis, diagnosis, and molecular targeted treatment for nasopharyngeal carcinoma*. Shanghai: Intech China, pp. 95-122.
- Chang ET, Adami H, 2006. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(10): 1765-77.
- Chatarina UW, 2010. Epidemiologi kanker nasofaring. Dalam: Pelatihan deteksi dini kanker nasofaring untuk dokter umum di puskesmas, Surabaya: Dept/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNAIR/ RSUD Dr. Soetomo, hal: 7-10.
- Chen PC, Yang CC, Wu CJ, LiunWS, Huang WL, Lee CC, 2014. Factors predict prolonged wait time and longer duration of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a multilevel analysis. *Plos One*, 9(10): 1-7.
- Cho WCS, 2007. Nasopharyngeal carcinoma: molecular biomarker discovery and progress. *Molecular Cancer*, 6:1-9.
- Chou J, Lin YC, Kim J, You L, Xu Z, He B, *et al.*, 2008. Nasopharyngeal carcinoma-review of the molecular mechanism of tumorigenesis. *Head Neck*, 30(7): 946-63.
- Clancy S, 2008. DNA damage and repair: mechanism for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1): 103-9. Available from: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/DNA-Damage-Repair-Mechanism-for-Maintaining-DNA-344#> Accessed September 9, 2014.
- Das P, Singal R, 2004. DNA methylation and cancer. *J Clin Oncol*, 22: 4632-42.
- Du ZM, 2012. Biomarkers in nasopharyngeal carcinoma. Dissertation, Larserics Digital Print AB, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden, pp. 1-10.
- Fosbinder RA, 2011. Radiation biology. In: Fosbinder RA, Orth D, eds. *Essential of radiologic science*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 303-20.

- Ghazali MV, Sastromihardjo S, Soedjarwo SR, Soelaryo T, Pramulyo H, 2002. Studi *cross sectional*. Dalam: Sastroasmoro S, Ismael S, ed. *Dasar – dasar metodologi klinis*, Edisi ke-2, Jakarta : CV Sagung Seto, hal.97-108.
- Gong Z, Zhu JK, 2011. Active DNA demethylation by oxidation and repair. *Cell Res*, 21: 1649-51.
- Guo X, Johnson RC, Deng h, Liao J, Guan L, Nelson GW, *et al.*, 2009. Evaluation of non viral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high risk population of Southern China. *Int J Cancer*, 124(12): 2942-7.
- Hashim NAN, Ramzi NH, Velapasamy S, Alex L, Chahil JK, Lye SH, *et al.*, 2012. Identification of genetic and non-genetic risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a southeast asian population. *AsPac J Cancer Prev*, 13(12): 6005-10.
- Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, Cartron PF, 2013. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells*, 2: 545-61.
- Hildesheim A, Apple RJ, Chen CJ, Wang SS, Cheng YJ, Klitz W, *et al.*, 2002. Association of HLA class 1 and 2 alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst*, 94: 1780-9.
- Hu C, Wei W, Chen X, Woodman CB, Yao Y, Nicholls JM, *et al.*, 2012. A global view of the oncogenic landscape in nasopharyngeal carcinoma: an integrated analysis at the genetic and expression level. *Plos One*, 7(7): e 41055.
- Hu C, 2010. Genetic and gene expression analysis of nasopharyngeal carcinoma. Dissertation, University of Birmingham Research Archive, University of Birmingham, Birmingham, England, pp. 22-31.
- Hutajulu SH, Indrasari SR, Indrawati LPL, Harijadi A, Duin S, Haryana SM, *et al.*, 2011. Epigenetic markers for early detection of nasopharyngeal carcinoma in a high risk population. *Molecular Cancer*, 10: 48-56.
- Hwang CF, Cho CL, Huang CC, Wang JS, Shih YL, Chang HW, 2002. Loss of cyclin d1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol*, 13: 1246-51.
- Kentjono WA, 2010. Karsinoma nasofaring: etiologi, gejala, diagnosis, deteksi dini, terapi, dan pencegahan. Pelatihan deteksi dini kanker nasofaring untuk dokter umum di puskesmas, Pasuruan, Dept/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNAIR - RSUD Dr. Soetomo, hal.8-40.

- Kentjono WA, 2012. Perkembangan terkini penatalaksanaan karsinoma nasofaring. Presentasi pada Indonesian Society of Oncology, Annual Scientific Meeting, Bali, Dept/SMF Ilmu Kesehatan THT-KL FK UNAIR - RSUD Dr. Soetomo, hal.1-25.
- Ko JY, Lee TC, Hsiao CF, Lin GL, Yen SH, Chen KY, *et al.*, 2002. Definition of three minimal deleted regions by comprehensive allelotyping and mutational screening of *h19*, *p16^{ink4a}*, and *p19^{arf}* genes in nasopharyngeal carcinoma. *Am Cancer*, 94(7): 1987-96.
- Krishna SM, James S, Sreelekha TT, Kattoor J, Balaram P, 2006. Primary nasopharyngeal cancer of Indian origin and the viral link- a preliminary study. *Austral-Asian J Cancer*, 5(4): 241-52.
- Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PML, Johnson PJ, Huang DP, 2002. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 8: 131-7.
- Lameshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK, 1990. Adequacy of sample size in health studies. Chicester: John Wiley & sons, pp. 1-2.
- Laantri N, Attaleb M, Kandil M, Naji F, Mouttaki T, Dardari R, *et al.*, 2011. Human papilloma virus detection in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Infect Agent Can*, 6: 3-8.
- Lee AWC, Li JH, Shi W, Li A, Ng E, Liu TJ, *et al.*, 2003. p16 gene therapy: a potentially efficacious modality for nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer Ther*, 2: 961-9.
- Li AA, Ng E, Lee A, Chia M, Liu TJ, Huang D, *et al.*, 2004. Potential efficacy of p16 gene therapy for ebv-positive nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 110: 452-8.
- Li J, Poi MJ, Tsai MD, 2011. Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16^{ink4a} and their relevance to cancer. *Biochemistry*, 50(25): 5566-82.
- Li W, Ray RM, Gao DL, Fitzgibbons ED, Seixos NS, Camp JE, *et al.*, 2005. Occupational risk factors for nasopharyngeal cancer among female textile workers in Shanghai China. *Occup Environ Med*, 63: 39-44.
- Lin DC, Meng X, Hazawa M, Nagata Y, Varela AM, Xu L, *et al.*, 2014. The genomic landscape of nasopharyngeal carcinoma. *Nat Genet*, 46: 866-71.

- Liu MT, Chen MK, Huang CC, Huang CY, 2015. Prognostic value of molecular markers and implication for molecular targeted therapies in nasopharyngeal carcinoma: an update in an era of new targeted molecules development. *World J Oncol*, 6(1): 243-61.
- Lo KW, Chung GTY, To KF, 2013. Acquired genetic and epigenetic alterations in nasopharyngeal carcinoma. In: Busson P, ed. *Nasopharyngeal carcinoma: keys translational medicine and biology*. Berlin: Landes Bioscience-Springer Science, pp. 61-76.
- Lo KW, Huang DP, Lau KM, 1995. p16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 55: 2039-43.
- Loewe L, 2008. Genetic mutation. *Nature Education*, 1(1): 113-4.
- Ma J, Cao S, 2010. The epidemiology of nasopharyngeal cancer. In: Lu JJ, Cooper JS, Lee AWM, eds. *Nasopharyngeal cancer multidisciplinary management*, Berlin : Springer, pp. 2-6.
- Mäkitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O’Sullivan B, 2003. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9: 2177-84.
- Mann CJ, 2003. Observational research methods. Research design II: cohort, cross sectional, and case-control studies. *Emerg Med J*, 20: 54-60.
- Martini S, 2010. Epidemiologi kanker nasofaring. Pelatihan deteksi dini kanker nasofaring untuk dokter umum di puskesmas, Pasuruan, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Airlangga, hal. 3-5.
- Moison C, Peugeot ALG, Arimondo PB, 2013. Dna methylation in cancer. Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/DNAMethylationID20127.html> Accessed June 3, 2014.
- Mulyarjo, 2002. Diagnosis dan penatalaksanaan karsinoma nasofaring. Dalam: Mulyarjo, Soedjak S, Wisnubroto, Harmadji S, Hasanusi R, Artono, ed. *Perkembangan terkini diagnosis dan penatalaksanaan tumor ganas tht-kl*. Surabaya: Lab/SMF Ilmu Penyakit THT FK UNAIR – RSUD Dr. Soetomo, hal. 38-48.
- Munir D, 2006. Peran hla pada karsinoma nasofaring. *Suplemen Majalah Kedokteran Nusantara*, 39(3): 324-9.
- Munir D, 2011. Association between hla-dqb1 genotypes with nasopharyngeal carcinoma in Batak ethnic group in Indonesia. *Biomed Research*, 22: 235-40.

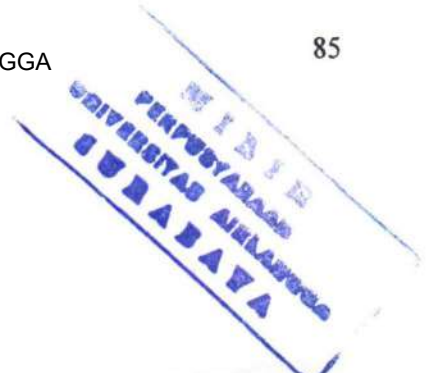
- National Comprehensive Cancer Network, 2011. NCCN clinical practice guideline in oncology (NCCN guidelines) head and neck cancer version 2. 2011.
- Osman I, Mercut R, Malin RD, Osman G, Craioiu S, Comanescu V, 2012. Clinical, histological, immunohistochemical and statistical aspects in malignant nasopharyngeal tumors. *Current Health Sci J*, 38(4): 150-8.
- Perez SR, Valdez AMC, Balcazar CHF, Edo FG, Silva LSL, Borbalas AL, *et al.*, 2014. Expression of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein (lmp1), p16 and p53 proteins in nonendemic nasopharyngeal carcinoma (npc): a clinicopathological study. *Arch Med Res*, 45: 229-36.
- Poi MJ, Yen T, Li J, Song H, Lang JC, Schuller DE, *et al.*, 2001. Somatic ink4a-arf locus mutation: a significant mechanism of gene inactivation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinogenesis*, 30: 26-36.
- Rayess H, Wang L, Srivatsan ES, 2012. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*, 130(8): 1715-25.
- Robinson M, Suh Y, Paleri V, Devlin D, Ayaz B, Pertl L, *et al.*, 2013. Oncogenic human papillomavirus-associated nasopharyngeal carcinoma: an observational study of correlation with ethnicity, histological subtype and outcome in a UK population. *Infectious Agents Can*, 8: 30-6.
- Roezin A, 1995. Deteksi dan pencegahan karsinoma nasofaring. Dalam: Pencegahan dan deteksi dini penyakit kanker, Perhimpunan Onkologi Indonesia, 274-88.
- Rothenberg SM, Ellisen LW, 2012. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*, 22(60): 1951-7.
- Sim EUH, Toh AKL, Tiong TS, 2008. Preliminary findings of down-regulated genes in nasopharyngeal carcinoma. *AsPac J Mol Biol Biotechnol*, 16(3): 79-84.
- Simons MJ, 2010. The origin of genetic risk for nasopharyngeal carcinoma: a commentary on is nasopharyngeal cancer really a “cantonese cancer”? *Chinese J Cancer*, 29(5): 527-35.
- Simons MJ, 2011. Nasopharyngeal carcinoma as a paradigm of cancer genetics. *Chinese J Cancer*, 30(2): 79-83.
- Soetjipto D, 1989. Karsinoma nasofaring. Dalam: Iskandar H, Munir M, ed. *Tumor telinga hidung dan tenggorok diagnosis dan penatalaksanannya*. Jakarta; FKUI, hal. 71-83.

- Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, Nevöt MAL, 2005. Mutation analysis of genes that control g1/s cell cycle in melanoma: tp53, cdkn1a, cdkn2a, and cdkn2b. *BMC cancer*, 5: 36-44.
- Su WH, Hildesheim A, Chang YS, 2013. Human leukocyte antigens and Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: old associations offer new clues into the role of immunity in infection-associated cancers. *Cancer Epid Prev*, 3: 1-9.
- Sukardja IDG, 2000. *Onkologi klinik*, Surabaya : Airlangga University Press, hal. 111-2.
- Tang M, Lautenberger JA, Gao X, Sezgin E, Hendrickson SL, Troyer JL, *et al.*, 2012. The principal genetic determinants for nasopharyngeal carcinoma in China involve the hla class 1 antigen recognition groove. *PloS Genetics*, 8(11): 1-11.
- Thompson LDR, 2007. Update on nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck Pathol*, 7: 12-7.
- Tsang CM, Deng W, Yip YL, Zeng MS, Lo KW, Tsao SW, 2014. Epstein-Barr virus infection and persistence in nasopharyngeal epithelial cells. *Chin J Cancer*, 33(11): 549-55.
- Tse LA, Yu ITS, Mang OWK, Wong SL, 2006. Incidence rate trends of histological subtypes of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *British J Can*, 95: 1269-73.
- Tulalamba W, Janvilisri T, 2012. Nasopharyngeal carcinoma signaling pathway: an update on molecular biomarkers. *Int J Cell Bio*, 2012: 1155-64.
- Umar B, Ahmed R, 2014. Nasopharyngeal carcinoma, an analysis of histological subtypes and their association with EBV, a study of 100 cases of Pakistani population. *Asian J Med Sci*, 5(4): 16-20.
- US National Library of Medicine, 2008. Kinds of mutation. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/possiblemutations> Accessed June 23, 2015.
- Vianna PM, Ferreira CR, Santos Neto PJ, Martines BMR, 2012. Cervical lymphadenopathy in childhood: nasopharyngeal carcinoma as achallenging diagnosis. *Autopsy Case Report*, 2(4): 53-60.
- Wang L, Yao L, Zhang S, Liang C, Cheng N, 1999. Relationship between expression of p16 protein and prognosis in carcinoma of nasopharynx. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 30(4): 394-400.

- Wang S, Xiao X, Zhou X, Huang T, Du C, Yu N, *et al.*, 2010. Tfp1-2 is a putative tumor suppressor gene frequently inactivated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer*, 10: 617-24.
- Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, *et al.*, 2004. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 10: 5684-91.
- Widschwendter M, Jones PA, 2002. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of dna methylation in cancer. *Clin Cancer Res*, 8: 17-21.
- Wildeman MAM, Herdini C, Indrasari SR, Vincent AD, Tjokronagoro M, Stoker S, *et al.*, 2013. Primary treatment results of nasopharyngeal carcinoma in Yogyakarta, Indonesia. In: Wildeman MAM, ed. *Current problems and possible solutions in the treatment of nasopharyngeal carcinoma in Indonesia*. PhD thesis, Library of University of Amsterdam, Amsterdam, Netherland, pp. 40-9.
- Xiang YN, Zhang WY, 2005. The clinical significance of p16 protein non expression and p16 gene inactivation by deletions and hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 34(6): 358-61.
- Zeng MS, Zeng YX, 2010. Pathogenesis and etiology of nasopharyngeal carcinoma. In: Lu JJ, Cooper JS, Lee AWM, eds. *Nasopharyngeal cancer multidisciplinary management*. Available from: <http://www.springer.com/978-3-540-92809-6> Accessed June 20, 2014.
- Zhang Z, Chen F, Kuang H, Huang G, 2012. Epigenetic of nasopharyngeal carcinoma. In: Chen SS, ed. *Carcinogenesis, diagnosis, and molecular targeted treatment for nasopharyngeal carcinoma*. Shanghai: InTech China, pp. 1-17.
- Zhou W, Feng X, Ren C, Jiang X, Liu W, Huang W, *et al.*, 2013. Over-expression of bcat1, a c-myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular Cancer*, 12: 53-63.
- Zhu L, Zhang Y, Zhang W, Yang S, Chen JQ, Tian D, 2009. Pattern of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, 10: 47-58.

LAMPIRAN

Lampiran 1



F.LITB.003



**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(" ETHICAL CLEARANCE ")**

50 / Panke.KKE / 1 / 2016

KOMITE ETIK RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN JUDUL :


"Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring"

PENELITI UTAMA : Sabilarrusydi, dr

**PENELITI LAIN : 1. Dr. Muhtarum Yusuf, dr., Sp.THT-KL(K), FICS
2. Prof. Dr. HMS Wiyadi, dr., Sp.THT-KL(K)**

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

SURABAYA, 28 JAN 2016
KETUA

(Prof. Hari Sukanto, dr., Sp.KK (K))
NIP. 19471115 197303 1 001



**PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN**
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8, Telp. 5501164
SURABAYA 60286



Lampiran 2

Penjelasan Penelitian untuk Disetujui (*Information for consent*)

Nama Peneliti : Sabilarrusydi, dr.
 Alamat : Manukan Lor 8/27, Surabaya
 Judul Penelitian : Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi
 Karsinoma Nasofaring

A. Tujuan penelitian & penggunaan hasilnya

- Tujuan : membuktikan asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF
- Hasil : memberikan informasi ilmiah asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi karsinoma nasofaring

B. Manfaat bagi peserta penelitian

- mutasi gen p16 dapat digunakan sebagai salah satu indikator prediksi respons terapi karsinoma nasofaring

C. Metode dan prosedur kerja penelitian

- Biopsi nasofaring dibagi 2 untuk pemeriksaan histo PA dan PCR
- Penderita dengan histo PA KNF sesuai kriteria inklusi dan eksklusi diikutkan dalam penelitian
- Pemeriksaan PCR dan sekuensing untuk mendapatkan mutasi gen p16

D. Risiko yang mungkin timbul

- Tidak ada

E. Efek samping penelitian

- Tidak ada

F. Tindak lanjut jika terjadi insidens saat dilaksanakan penelitian

- Tidak ada

G. Jaminan kerahasiaan

- Hasil penelitian langsung disampaikan ke penderita

- H. Hak untuk menolak menjadi subyek penelitian
- Terlampir
- I. Partisipasi berdasarkan kesukarelaan dan hak untuk mengundurkan diri
- Terlampir
- J. Subjek dapat dikeluarkan dari penelitian
- Bila anda tidak mentaati instruksi yang diberikan oleh para peneliti, anda dapat dikeluarkan setiap saat dari penelitian ini
- K. Sumber biaya penelitian
- Peserta tidak dikenakan biaya apapun selama mengikuti penelitian ini
- L. Bila Saudara menginginkan informasi lebih lanjut untuk lebih memahami penelitian ini, dapat menghubungi peneliti HP 085235060313 pada jam 08.00-12.00 di URJ THT-KL RSUD Dr. Soetomo Surabaya

Surabaya,

Yang memberi penjelasan

Yang menerima penjelasan

(Sabilarrusydi, dr.)

()

Saksi I

Saksi II

()

()



**PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN**
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8, Telp. 5501164
SURABAYA 60286



Lampiran 3

LEMBAR PERSETUJUAN MENGIKUTI PENELITIAN (*Informed consent*)

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat :

Tlp / Email :

Fakultas / Instansi :

Sesudah mendengarkan penjelasan yang diberikan dan diberikan kesempatan untuk menanyakan yang belum dimengerti, dengan ini memberikan :

PERSETUJUAN

Mengikuti penelitian sebagai subyek penelitian dengan judul penelitian **“Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring”** dan sewaktu-waktu saya berhak mengundurkan diri.

Demikian persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya,
Yang Membuat Pernyataan

(.....)

Saksi I

Saksi II

(.....)

(.....)



**PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN**
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8, Telp. 5501164
SURABAYA 60286



Lampiran 4

LEMBAR PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIS

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :
Umur :
Alamat :
Tlp / Email :
Fakultas / Instansi :

Sesudah mendengarkan penjelasan yang diberikan dan diberikan kesempatan untuk menanyakan yang belum dimengerti, dengan ini memberikan :

PERSETUJUAN

Untuk dilakukan tindakan medis
berupa:.....

Dengan judul penelitian: **“Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring”**

Sewaktu-waktu saya berhak mengundurkan diri.

Demikian persetujuan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya,
Yang Membuat Pernyataan

(.....)

Saksi I

Saksi II

(.....) ASOSIASI ANTARA MUTASI... (..... Sabilarrusydi)



**PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOETOMO
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN**
Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8, Telp. 5501164
SURABAYA 60286



Lampiran 5

LEMBAR PENGUNDURAN DIRI

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama :

Umur :

Alamat :

Tlp / Email :

Fakultas / Instansi :

Dengan ini menyatakan MENGUNDURKAN DIRI sebagai subjek penelitian

Dengan judul penelitian: **“Asosiasi Mutasi Gen p16 dengan Tipe Histopatologi Karsinoma Nasofaring”**

Demikian lembar pengunduran diri ini saya buat dengan penuh kesadaran dan tanpa paksaan.

Surabaya,
Yang Membuat Pernyataan

(.....)

Saksi I

Saksi II

(.....)

(.....)

Lampiran 6**LEMBAR PENGUMPUL DATA**

No. Urut penelitian :..... Tanggal:.....

No. Rekam medis :.....

I. DATA DASAR

Nama :.....

Umur :.....tahun

Jenis kelamin : laki-laki/ perempuan

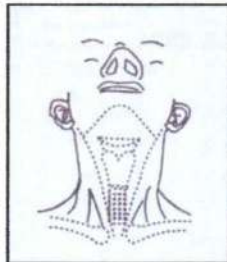
Suku bangsa :.....

Pekerjaan :.....

Alamat :.....

II. DATA KLINIS

Nodul di leher : ukuran :



jumlah :

lokasi :

mobilitas :

Metastasis paru : ada / tidak

USG abdomen *upper-lower* : normal / metastasisGambaran CT *scan* : T1 T2 T3 T4

Diagnosis PA : WHO tipe 1 2 3

Mutasi gen p16 : ada / tidak

III. DIAGNOSIS

KNF Stadium I II III IV

Lampiran 7**TEKNIK PENGECATAN HEMATOKSILIN EOSIN CARA MEYER****Deparafinisasi :**

Celupkan preparat dalam :

- Xilol teknis selama 5 menit
- Xilol teknis selama 5 menit
- Xilol teknis selama 5 menit

Hidrasi

Masukkan preparat dalam :

- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol 80% selama 2 menit
- Alkohol 70% selama 2 menit

Celupkan pada air mengalir selama 10 menit

Masukkan dalam Meyer's Hematoksilin selama 15 menit

Cuci dengan air mengalir

Lihat dengan Mikroskop biasa

Masukkan dalam larutan Eosin 1% selama 30 detik

Dehidrasi

- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol 96% selama 2 menit
- Alkohol 80% selama 2 menit
- Alkohol 70% selama 2 menit

Clearing

Celupkan preparat dalam :

- Xilol teknis selama 5 menit
- Xilol teknis selama 5 menit
- Xilol teknis selama 5 menit

Mounting medium dengan *EZ Mount*

(Standar Operasional Prosedur SMF/Instalasi Patologi Anatomi RSUD Dr.Soetomo, Prosedur Tetap Pewarnaan Hematoksilin-Eosin, 2009)

Lampiran 8

PEMERIKSAAN MUTASI GEN p16 DENGAN TEKNIK PCR

Prosedur Ekstraksi DNA Jaringan

1. Pipet 20 μ l QIAGEN Protease (atau proteinase K) ke dalam 1,5 ml *microcentrifuge tube*.
2. Masukkan \pm 25 mg sampel jaringan. Tambahkan 180 μ l *buffer* ATL kedalam *tube*.
3. Inkubasi pada suhu 56°C selama 24 jam (sampai jaringan larut).
4. Tambahkan 200 μ l *buffer* AL kedalam sampel, kemudian *vortex* selama 15 detik.
5. Tambahkan 200 μ l etanol 96% dan campur dengan cara di *vortex* selama 15 detik, kemudian *spin down*.
6. Masukkan campuran *step* 5 kedalam QIAamp Mini *spin column* (2 ml *collection tube*).
7. *Sentrifuge* 8.000 rpm selama 1 menit.
8. Buang 2 ml *collection tube* yang berisi filtrat dan ganti dengan 2 ml *collection tube* yang baru.
9. Tambahkan 500 μ l *buffer* AW1, lalu *sentrifuge* 8000 rpm selama 1 menit.
10. Buang 2 ml *collection tube* yang berisi filtrat dan ganti dengan 2 ml *collection tube* yang baru.
11. Tambahkan 500 μ l *buffer* AW2, lalu *sentrifuge* 13.000 rpm selama 3 menit.
12. Buang 2 ml *collection tube* yang berisi filtrat dan ganti dengan 2 ml *collection tube* yang baru.
13. *Sentrifuge* lagi 13.000 rpm selama 1 menit.
14. Pindah QIAamp Mini *spin column* pada 1,5 ml *microcentrifuge tube*. Tambahkan 50 μ l *buffer* AE atau *distilled water*.
15. Inkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 1 menit kemudian *sentrifuge* 8.000 rpm selama 1 menit.
16. Didapatkan 50 μ l DNA *template*.

Prosedur PCR :

2X Master <i>mix</i> (intron)	12,5 μ l
D.W	0,5 μ l
Primer EAE1	1 μ l
Primer EAE2	1 μ l
<i>Template</i>	<u>5 μl</u>
	20 μ l

Pembuatan Gel Elektroforesis

1. Encerkan TBE 10x menjadi TBE 1x dengan perbandingan 1:10.
2. Siapkan cetakkan gel elektroforesis sesuai dengan kebutuhan.
3. Cetakkan kecil berisi 20 ml. Ambil TBE 1x sebanyak 20 ml dengan konsentrasi gel 2%.
4. Timbang sebanyak 0,4 gr gel agaroser, kemudian tuang pada 20 ml TBE 1x.
5. Panaskan dalam *microwave* selama \pm 2 menit (sampai larut dan bening), jangan sampai mendidih.
6. Tuang agar dalam cetakan dan tunggu hingga padat.
7. Selama \pm 30 menit.

Prosedur Purifikasi

1. Tambahkan 100 μ l *buffer* PB ke dalam 20 μ l PCR produk.
2. Pindahkan campuran ke dalam 2 ml *collection tube*.
3. *Sentrifuge* 14000 rpm selama 1 menit. Gantikan *collection tube* dengan yang baru.
4. Tambahkan 750 μ l *buffer* PE, kemudian *sentrifuge* 14000 rpm selama 1 menit.
5. *Sentrifuge* kembali 14000 rpm selama 1 menit untuk mengeringkan.
6. Gantikan *column* pada tube 1,5 ml.
7. Untuk melarutkan DNA, tambahkan 50 μ l *buffer* EB pada bagian tengah membran *column*. Kemudian *sentrifuge* 14000 rpm selama 1 menit.
8. Didapatkan 50 μ l DNA hasil purifikasi.

Prosedur *Labeling*

1. Tambahkan *Big dye ready reaction mix* V1.1 sebanyak 2 μ l.
2. Tambahkan *Big dye Buffer* 1 μ l.
3. Tambahkan primer *Forward/ Revers* 1 μ l.
4. Tambahkan 6 μ DNA *template* hasil purifikasi.

Prosedur Presipitasi Metode *Vaccum Pump*

1. Pindahkan DNA *labeling* ke tabung 1,5 ml.
2. Tambahkan 2,5 μ l Natrium Asetat (NaAC)
3. Tambahkan 50 μ l Etanol 100%, sentrifuge 15.000rpm selama 15 menit pada suhu 4⁰C.
4. Ambil sisa Etanol dengan hati-hati.
5. Tambahkan kembali 80 μ l Etanol 70 %, sentrifuge 15.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4⁰C. Bersihkan sisa Etanol dengan pipet.
6. Keringkan pelet DNA dengan *Vaccum Pump* selama 15 menit.
7. Kemudian tambahkan 25 μ l Hipi Formaldehid (HD). Panaskan 95⁰C selama 2 menit.
8. Inkubasi di es selama 3 menit, *spin down*. Pindahkan ke tabung 0,5 ml untuk sekuensing.
9. Masuk mesin sekuensing.

Lampiran 9*Dummy table*

Mutasi Gen p16	Tipe Histopatologi KNF (WHO)			Total
	Tipe 1	Tipe 2	Tipe 3	
Mutasi negatif				
Mutasi positif				
Total				

Lampiran 10

ANALISIS STATISTIK

Correlations

		Tipe_HistoPA	Mutasi
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	-.132
	Tipe_HistoPA		.568
	Sig. (2-tailed)		
	N	21	21
	Correlation Coefficient	-.132	1.000
	Mutasi	.568	
	Sig. (2-tailed)		
	N	21	21

Correlations

		Mutasi	Stadium
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.101
	Mutasi		.663
	Sig. (2-tailed)		
	N	21	21
	Correlation Coefficient	.101	1.000
	Stadium	.663	
	Sig. (2-tailed)		
	N	21	21

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Umur	.158	21	.187	.965	21	.623

Correlations

			Sex	Mutasi
Spearman's rho	Sex	Correlation Coefficient	1.000	-.115
		Sig. (2-tailed)	.	.621
		N	21	21
	Mutasi	Correlation Coefficient	-.115	1.000
		Sig. (2-tailed)	.621	.
		N	21	21

Correlations

		Umur	Mutasi
Umur	Pearson Correlation	1	-.094
	Sig. (2-tailed)		.686
	N	21	21
Mutasi	Pearson Correlation	-.094	1
	Sig. (2-tailed)	.686	
	N	21	21

Correlations

			Mutasi	Pekerjaan
Spearman's rho	Mutasi	Correlation Coefficient	1.000	-.055
		Sig. (2-tailed)	.	.812
		N	21	21
	Pekerjaan	Correlation Coefficient	-.055	1.000
		Sig. (2-tailed)	.812	.
		N	21	21

Hubungan mutasi gen p16 dengan stadium KNF (stadium I-II vs III-IV)

Correlations

			Mutasi	Stadium
Spearman's rho	Mutasi	Correlation Coefficient	1.000	-.132
		Sig. (2-tailed)	.	.567
		N	21	21
	Stadium	Correlation Coefficient	-.132	1.000
		Sig. (2-tailed)	.567	.
		N	21	21

Asosiasi mutasi gen p16 dengan tipe histopatologi KNF (WHO tipe I-II vs III)

Correlations

			Mutasi	Tipe_Histo PA
Spearman's rho	Mutasi	Correlation Coefficient	1.000	-.132
		Sig. (2-tailed)	.	.567
		N	21	21
	Tipe_HistoPA	Correlation Coefficient	-.132	1.000
		Sig. (2-tailed)	.567	.
		N	21	21

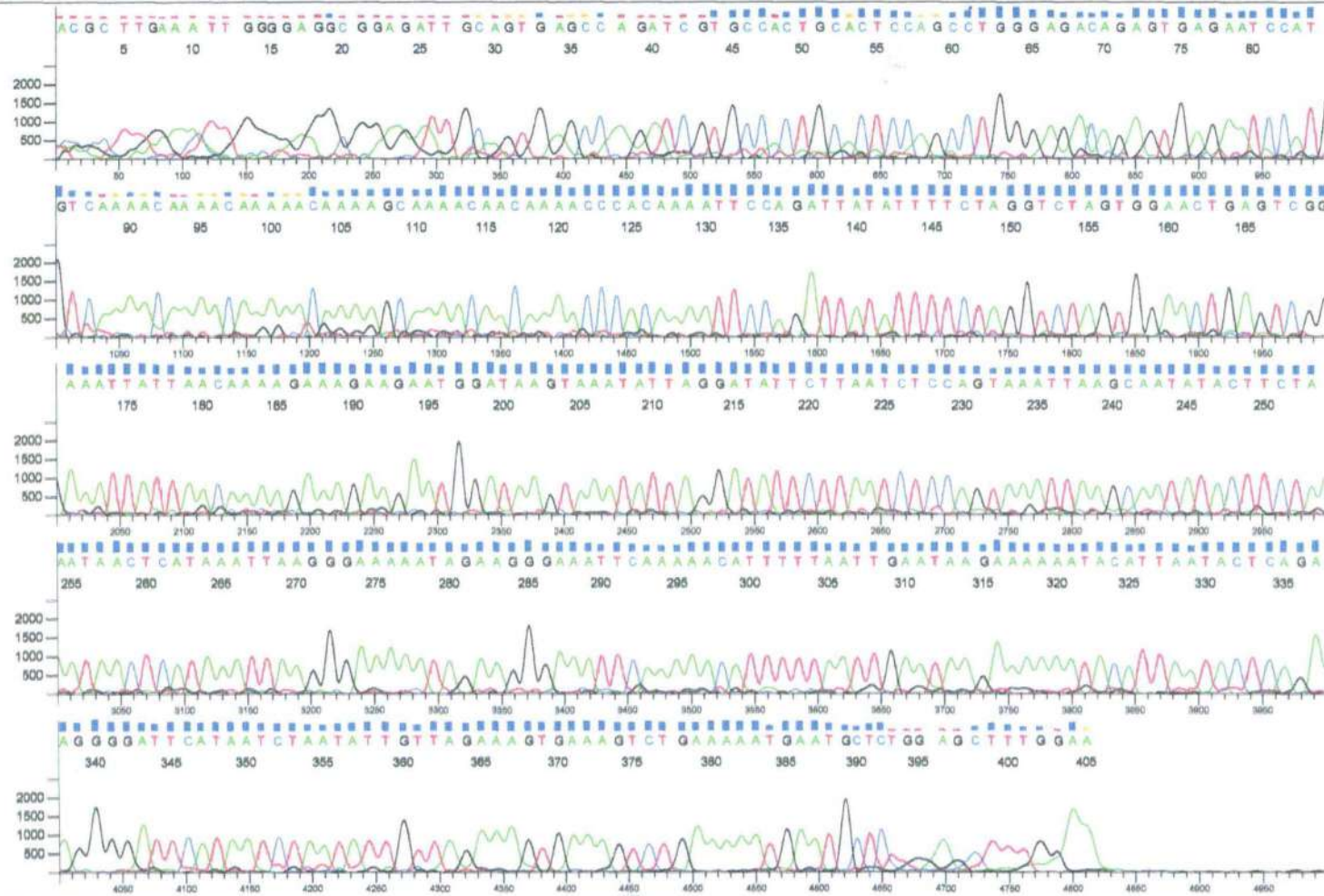
Rekapitulasi data penelitian

No	Nama	L/P	Umur (th)	Suku	Pekerjaan	Register	Histo PA (WHO)	No PA	Std	PCR (DBS)	Mutasi
1	Mujito	L	54	Jawa	Petani	12413588	Tipe 3	T.3362/15	IV	+	-
2	Tuman Ajen	P	52	Dayak	Ibu RT	12424206	Tipe 3	T.4524/15	IV	-	-
3	Sutikno	L	53	Jawa	Wiraswasta	12431219	Tipe 3	T.5245/15	IV	-	-
4	Achmad Safi'i	L	61	Madura	Petani	12426959	Tipe 3	T.5123/15	IV	-	-
5	Jalil	L	53	Jawa	Kuli bangunan	12428173	Tipe 3	T.5026/15	III	+	-
6	Sudari	P	54	Madura	Ibu RT	12428768	Tipe 3	T.5106/15	IV	+	-
7	Saiful Ulum	L	43	Jawa	Guru	12431952	Tipe 3	T.5299/15	III	+	+
8	Sumidah	P	50	Jawa	Ibu RT	12203431	Tipe 3	T.5498/15	IV	-	-
9	Surati	P	56	Jawa	Ibu RT	12434492	Tipe 3	T.5309/15	IV	+	-
10	Marti	P	65	Jawa	Petani	12433387	Tipe 3	T.5570/15	IV	+	+
11	Moh. Rivai	L	39	Madura	Wiraswasta	12434877	Tipe 3	T.5603/15	IV	+	-
12	Sumarto	L	49	Jawa	PNS	12434969	Tipe 3	T.5999/15	II	+	-
13	Muabi	L	71	Madura	Petani	12439725	Tipe 3	T.6148/15	IV	+	-
14	Eva Safarina	P	24	Dayak	Ibu RT	12440941	Tipe 3	T.6218/15	IV	+	-
15	Mimik Khutofa	P	51	Jawa	Ibu RT	12445792	Tipe 3	T.6947/15	III	+	-
16	Paidi	L	41	Jawa	Wiraswasta	12440724	Tipe 3	T.6540/15	IV	+	-
17	M. Farid	L	48	Jawa	Sopir	12432836	Tipe 1	T.5699/15	IV	+	-
18	M. Chamim	L	49	Jawa	Wiraswasta	12456312	Tipe 3	T.7895/15	II	-	-
19	Rafi'i	L	64	Madura	Petani	12456213	Tipe 3	T.8069/15	IV	+	-
20	Syaiful Hamzah	L	32	Jawa	Wiraswasta	12462638	Tipe 2	T.8511/15	IV	-	-
21	Rio	L	60	Madura	Wiraswasta	12191742	Tipe 1	T.2638/15	II	-	-

Signal: G:235 A:230 T:204 C:134 AvgSig: 200

Ch#:8 W:B4 Plate Name:Unassigned

TS:43 CRL:356 QV20+:343



Inst Model/Name:310 /ABI PRISM 310

Sequence Scanner v1.0



Printed on: Dec 07, 2015 11:39:57 GMT+07:00

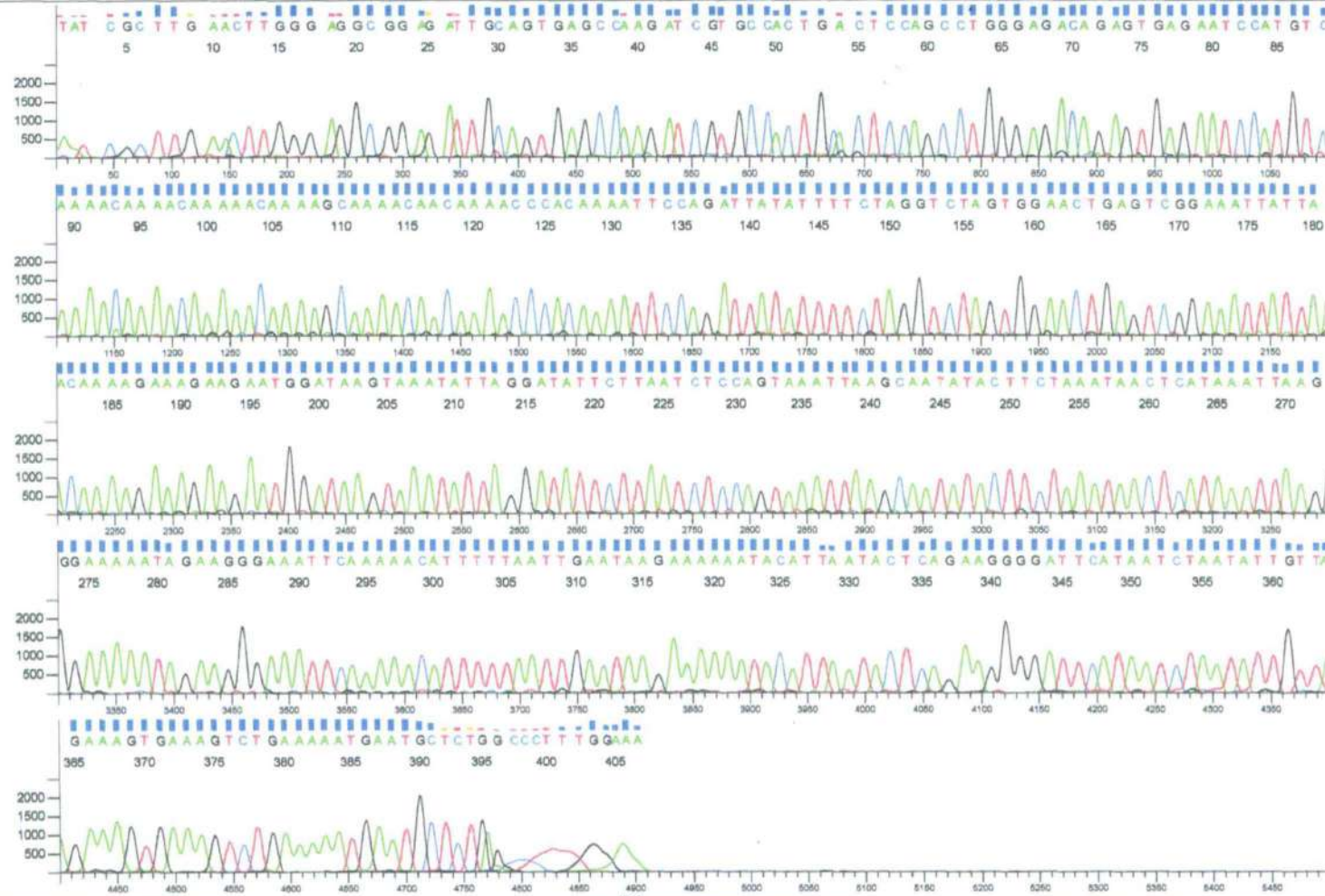
Electropherogram Data Page 1 of 1

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Signal: G:714 A:881 T:687 C:315 AvgSig: 649

C#:7 W:A9 Plate Name:Unassigned

TS:54 CRL:386 QV20+383



Inst Model/Name:310 /ABI PRISM 310

Sequence Scanner v1.0



Printed on: Dec 28, 2015 10:35:21 GMT+07:00

Electropherogram Data Page 1 of 1